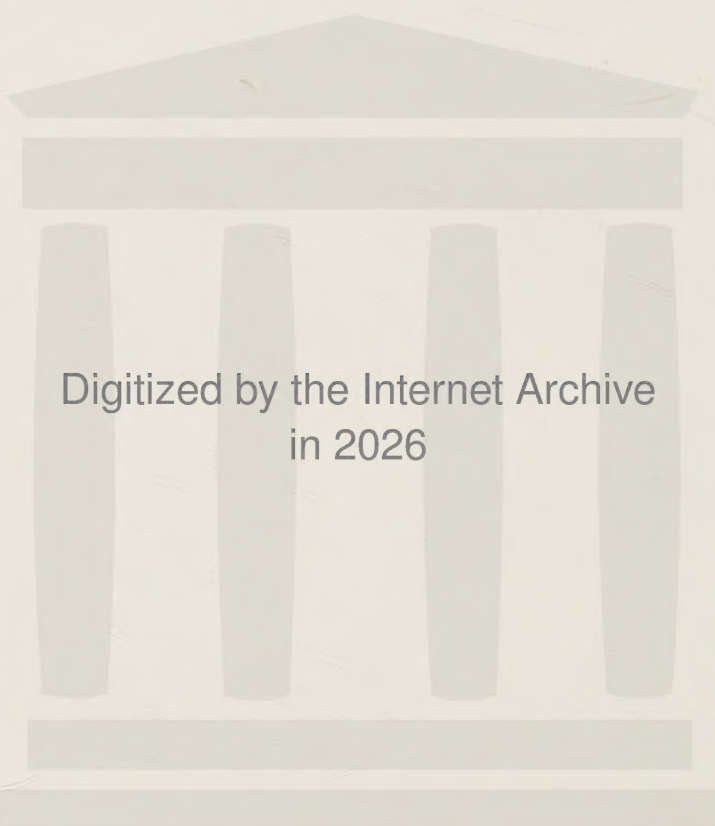


Cornelia Engel

Nachweis von Ia-Antigen
auf Leukämiezellen
durch Zytotoxizitätstest
und spezifisch Bakterien
bindende Antikörper

Diss. München
1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0077

Aus dem
Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München
Leiter: Prof. Dr. S. Thierfelder

Nachweis von Ia-Antigen auf Leukämiezellen
durch Zytotoxizitätstest
und spezifisch Bakterien bindende Antikörper

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cornelia Engel
aus
Wuppertal

München

1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Huhn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.6.1983

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	
1. Materialien	
1.1. Blut und Knochenmark	6
1.2. Anti-Ia-Globulin	7
1.3. Kaninchen-Normal-Immunglobulin	8
1.4. Bakterien	8
2. Mikrozytotoxizitätstest	
2.1. Beschreibung des Tests	9
2.2. Bewertungskriterien	10
3. Bakterienbindungstest	
3.1. Beschreibung des Tests	13
3.2. Auswertung der Bakterienbindung	14
3.3. Modifikation des Tests	
3.3.1. Vergleich von Zytozentrifugen- und Ausstrichpräparaten	15
3.3.2. Vergleich des Einflusses von fetalem Kälberserum oder Rinderserumalbumin als Zusatz zum Medium	17
3.3.3. Einfluß eines Natriumazid-Zusatzes	19
3.3.4. Variationen der Staphylokokkenmenge	20
3.3.5. Veränderung der Inkubationszeit nach Bakterienzugabe	21
3.3.6. Verwendung von unterschiedlichen Antiserumverdünnungen	21
3.3.7. Veränderung der Inkubationszeit nach Antiserumzugabe	22

3.3.8.	Verwendung von Vollblut	22
3.3.9.	Testung von mit Komplement lysierten Zellen	23
4.	Spontanrosettenbildung von Lymphozyten mit Hammelerythrozyten	25
5.	Komplementbindungsreaktion	25
6.	Immunfluoreszenztest	26
III. Ergebnisteil		
1.	Einführung	28
2.	Zell-Linien	30
3.	Übersicht über die untersuchten Leukämien	32
4.	Bedeutung der Markerexpression für Klinik, Therapie und Prognose der akuten lymphatischen Leukämien	34
4.1.	c-ALL	35
4.2.	c-ALL-Rezidive	44
4.3.	c/T-, T-ALL	47
4.4.	Akute undifferenzierte Leukämien (AUL)	49
5.	Chronisch lymphatische Leukämien (CLL)	54
6.	Akute myelo-monozytäre Leukämien (AMML)	56
7.	Chronisch myeloische Leukämien (CML)	62
8.	Blastenkrisen (BC) bei chronisch myeloischer Leukämie	62
9.	Megakaryozytäre Myelose	67
10.	Sézary-Syndrom	67
11.	Prolymphozyten-Leukämie	68
12.	Haarzell-Leukämie	69
13.	Bakterienbindungstest	71

IV. Diskussion

- | | | |
|----|--|----|
| 1. | Zur Bedeutung des Ia-Antigens als Differenzierungsantigen auf Zelloberflächen | 84 |
| 2. | Besprechung der eigenen Ergebnisse | 86 |
| 3. | Zusammenfassende Betrachtung über die Ia-Antigen-Ausprägung im Verhältnis zum Differenzierungsgrad leukämischer Zellen | 93 |
| 4. | Bedeutung des Bakterienbindungstests im Rahmen immunologischer Untersuchungen | 97 |

V.	Zusammenfassung	100
----	-----------------	-----

VI.	Literaturverzeichnis	102
-----	----------------------	-----

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AG:	Antigen
ALL:	Akute lymphatische Leukämie
c-ALL:	common ALL oder ALL vom non-T/non-T-Zelltyp, entspricht dem Begriff Null-ALL
AML:	Akute myeloische Leukämie
AMML:	Akute myelo-monozytäre Leukämie
BC:	Blastenkrise der chronisch myeloischen Leukämie
BSA:	Rinderserumalbumin
CI:	Cytotoxischer Index
CLL:	Chronisch lymphatische Leukämie
CML:	Chronisch myeloische Leukämie
E-Rosetten:	Hammelerythrozytenrosetten
FCS:	Fetales Kälberserum
Hex I:	Hexosaminidase
HUTLA:	Humanes T-Lymphozytenantigen
IF:	Immunfluoreszenztest
KBR:	Komplementbindungsreaktion
KM:	Knochenmark
My:	Myeloische Antigene
PBL:	Periphere Blutlymphozyten
PBZ:	Periphere Blutzellen
PSC:	Pluripotente Stammzelle
SmIg:	Oberflächenimmunglobulin
TdT:	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase

I. EINLEITUNG

In den letzten Jahren sind viele Versuche unternommen worden, Zellen bezüglich ihres biologischen Verhaltens und ihrer immunologischen Eigenschaften zu charakterisieren. Gerade im Zusammenhang mit pathologischen Proliferationsprozessen weißer Blutzellen haben immunologische Untersuchungsmethoden zur Diagnostizierung der Erkrankung zunehmend an Bedeutung gewonnen (30,52,33).

Zippin (106) und Simone (89) hatten beschrieben, daß eine bestimmte klinische Symptomatik mit dem Verlauf und der Prognose der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) eng verknüpft ist. Sie sahen die ALL noch als eine Erkrankung an, die in sich nicht weiter klassifiziert werden konnte. Neuere Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß leukämische Zellen "eingefrorene" Differenzierungsstufen der normalen Hämpoese repräsentieren. Jeder Schritt im Laufe der Zelldifferenzierung kann Ausgangspunkt eines pathologischen Proliferationsprozesses sein. Ein Schema, dem eine Zuordnung der Zellen entsprechend ihrem Differenzierungsgrad zugrunde liegt (96, 80), wird auch bei meinen Untersuchungen verwendet. Die Tendenz zur möglichst genauen Differenzierung der Leukämien unter morphologischen, zytochemischen und immunologischen Gesichtspunkten zielt darauf ab, die Krankheit in Hinblick auf klinischen Verlauf und Prognose ebenso differenziert zu therapieren (14,19,29,38,97).

Voraussetzung für die exakte Diagnostik sind genaue Kenntnisse der antigenen Strukturen auf den Zellmembranen von Leukozyten, Lymphozyten und ihren Vorstufen. Bei den Lymphozyten können B- und T-Zellen unterschieden werden. Über die Entwicklungsstätte von B-Lymphozyten bestehen im menschlichen Organismus noch Unklarheiten (99). Bei Vögeln wurde die Bursa Fabricii als

Reifungsorgan identifiziert (99). T-Zellen reifen unter Thymuseinfluß heran (99). Bisher wurden Oberflächenimmunglobulin (24), der Fc-Teil von Immunglobulin (21), Rezeptoren für die Komplementkomponente C3 (63,8), sowie Epstein-Barr-Virus-Rezeptoren (51) als Membranmarker und die Fähigkeit mit Mäuseerythrozyten Spontanrosetten zu bilden (16), als spezifische Eigenschaft von B-Lymphozyten angesehen. Theta-Antigen (72) und dessen serologischer Nachweis (2,90,102) genauso wie Rezeptoren für Hammelerythrozyten (23,50,105) werden als Charakteristikum von T-Zellen angesehen. Myeloisches Antigen charakterisiert Zellen der Granulopoese (45).

Eine Möglichkeit des Nachweises von reifen T-Zellen besteht in der Herstellung von gegen dieses T-Zell-Antigen gerichteten Antiseren. Bei Inkubation von Zellen, Antikörpern und Komplement kommt es dann zu Immunphänomenen wie z. B. Komplementfixation mit meßbarem Komplementverbrauch und Zytolyse (2,90). Erste Versuche zur Herstellung von Anti-T-Globulin wurden bereits 1963 von Reif et al. (71) unternommen, aber erst erweiterte und verfeinerte Absorptionstechniken lieferten ein hochspezifisches, heterologes Antiserum gegen menschliche Thymozyten, das auch in anderen Testsystemen eingesetzt werden kann (82,81). Diese Zellen besitzen außerdem die Eigenschaft, spontan Hammelerythrozyten anzulagern (siehe II.4).

Weitere Forschungsergebnisse zeigten, daß ein gegen T-Lymphozyten hergestelltes Antiserum nach der Absorption mit peripheren T-Lymphozyten noch mit einer Subpopulation von T-Zellen reagiert, von denen angenommen wird, daß sie einer früheren Reifungsstufe angehören. Dieses Antiserum dient also dem Nachweis des sogenannten Pre-T-Antigen, das als Teilkomponente des bisher als einheitlich angesehenen T-Antigens betrachtet wird (77).

Als spezifischer Marker für B-Lymphozyten können Oberflächenimmunglobuline (SmIg) angesehen werden (25,69), wobei IgM als Antikörperklasse dominiert, aber nicht als alleinige Immunglobulinart auf einer Zelle vorkommen muß (70). Membrangebundenes Immunglobulin wird als Antigenrezeptor angesehen (15).

Im Rahmen der immunologischen Klassifizierung von Leukämien zeigte sich, daß sich einige ALL dem Nachweis mit T- oder B-Zellmarkern entziehen. Es gelang die Herstellung eines Antiserums, das nach etlichen Absorptionprozeduren ausschließlich mit leukämischen Blasten von akuten lymphatischen Leukämien (32,79,78) und auch zum Teil mit Zellen aus lymphoiden Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie reagiert (48). Dieses Antiserum reagiert spezifisch mit dem c-ALL-Antigen, das bei den genannten Leukämieformen nachweisbar ist.

Leukämien mit vorherrschender Proliferation von Zellen der myeloischen Reihe werden meist mit Hilfe morphologischer und zytochemischer Untersuchungen charakterisiert. Sie führen besonders bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) zur Diagnose. Schwierigkeiten ergeben sich aber bei sehr unreifen Zellformen, wie sie bei akuter myeloischer Leukämie (AML) und Blastenkrise (BC) bei CML vorkommen. Dabei können gegen myeloische Zellen gerichtete Antiseren weiterhelfen. Auch hier waren spezielle Absorptionsschritte bei der Herstellung des Antiserums erforderlich, um die Erfassung unspezifischer antigenener Determinanten zu verhindern (44,45).

Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Vorkommen und dem Nachweis des Ia-Antigens auf Leukämiezellen. Dieses Antigen wird als Genprodukt des "Major Histocompatibility Complex (MHC)" und zwar des vierten Locus, HLA-D, angesehen. Experimente von Hess führen zu dem Schluß,

daß es bei dem Glykoprotein Ia (Ia für immune associated) und den H₂-Antigenen der I-Region bei Mäusen strukturelle Ähnlichkeiten gibt, die eine gemeinsame genetische Kodierung vermuten lassen. Genprodukte des HLA-D Komplex haben die biologische Funktion zur Stimulation von "mixed leucocyte cultures", wobei sich diese Funktion auf Subpopulationen von Lymphozyten und Makrophagen beschränkt (41,53,100). Außerdem soll Ia-Antigen die genetische Kontrolle der Immunantwort, graft-Versus-host-Reaktionen, Transplantatabstoßungsreaktionen und zelluläre Interaktionen im Immunsystem beeinflussen (39). Ein Ia-System, das dem der Maus ähnelt, wird ebenfalls beim Menschen angenommen. Das Ia-Antigen ist außer auf Lymphozyten und Makrophagen ferner auf Epidermalzellen, Endothelzellen der Nabelschnurvene, Spermien und fetalen Leberzellen in der 14. Woche zu finden (100).

Ia-Antigen wurde von mir mit Hilfe serologischer Prinzipien nachgewiesen. Dazu wurden der Mikrozytotoxizitätstest, der von Mittal et al. (65) beschrieben wurde, und ein Testsystem, das spezifisch Bakterien bindende Antikörper verwendet, benutzt. Diese zuletzt genannte Methode wurde erstmals von Gahmberg (26) vorgestellt.

Im zytotoxischen Test geht im positiven Fall die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer Komplementaktivierung einher, was zur Zell-Lyse führt. Die Vitalität der Zelle wird durch ihr Färbeverhalten oder im Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Zellsuspensionen, die durch Dichtegradiententrennung mit Ficoll-Hypopaque aus peripherem Blut und Knochenmarkspunktaten gewonnen wurde, sind bezüglich ihrer Zellpopulationen heterogen, da sich in ihr Lymphozyten, Monozyten und unreife kernhaltige Zellen befinden (10).

Im Zytotoxizitätstest läßt sich also lediglich eine Aussage darüber machen, ob eine Reaktion zwischen Antigen und Antikörper stattgefunden hat oder nicht. Eine morphologische Beurteilung der Zelle, die lysiert wurde, ist nicht möglich. Von Gahmberg (26) wird erstmals eine Technik vorgestellt, bei der eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem Bakterien-Indikator-System verknüpft wird. Hierbei kann mittels einer gebräuchlichen Färbung zur Differenzierung von Blutzellen (z. B. die Panoptische Färbung nach Pappenheim) die Morphologie der Zelle beurteilt werden, an der die Reaktion von Antigen und Antikörper stattgefunden hat. Angewendet wurde diese Methode, um Glycophorin bei reiferen Zellen innerhalb der Erythropoese nachzuweisen. Gahmberg verwendet hierfür Protein A synthetisierende Staphylokokken, die eine hohe Affinität zum Fc-Teil von Antikörpern haben. Die Bakterien lagern sich im Falle einer abgelaufenen Antigen-Antikörper-Reaktion rosettenartig um die Zelle. Im Rahmen meiner Untersuchungen wurde eine Methode entwickelt, die geeignet ist, eine Ia-Antigen-Ausprägung von Zellen der weißen Blutzellreihe mit gegen das Antigen gerichteten Antikörpern durch Bakterienanlagerung darzustellen. Neben der morphologischen Zuordnung der Zellen mit Ia-Antigen soll aufgezeigt werden, bei welchen Leukämien und in welchem quantitativen Umfang Ia-Antigen bei den verschiedenen Leukämiegruppen repräsentiert ist, um eine weitergehende Klassifizierung zu ermöglichen.

Ia-Antigen kann als geeigneter Parameter für eine Prognosestellung bei leukämischen Erkrankungen angesehen werden. Dies wurde durch Untersuchungen von Sallan (85) für die ALL bei Kindern belegt. Hier konnte eine Korrelation zwischen Ia-Antigen-Ausprägung und Verlauf der Erkrankung festgestellt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1 Blut und Knochenmark

Für die Ausführung des Zytotoxizitäts- und Rosettentests mußten die verwendeten Vollblut- und Knochenmarksproben einer Aufbereitungsprozedur unterworfen werden. Es erfolgte eine Zelltrennung durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Isopaque (D: 1,077 gm/ml) nach der Methode von Böyum (10). Dabei wird Ficoll-Isopaque mit Vollblut bzw. Knochenmarkblut im Verhältnis 1:2 überschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 1300 g werden die Zellen, die sich in der Interphase zwischen Ficoll-Isopaque-Lösung und Serum angesammelt haben mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die Zellsuspension wird im Verhältnis 1:2 mit RPMI 1640, dem 10 % inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurde, gemischt und bei 280 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes schließt sich ein zweiter Waschvorgang mit RPMI 1640 + 10% FCS für 10 Minuten bei 190 g an.

In der Interphase werden Lymphozyten, Monozyten, Promyelozyten, Myelozyten und andere kernhaltige Zellen früher Entwicklungsstufen gesammelt, während sich Erythrozyten und Granulozyten bei der Trennung mit Ficoll-Isopaque am Boden des Reagenzglases absetzen. Erythrozyten, die durch den Trennvorgang mit Ficoll-Isopaque nicht zu entfernen waren, können durch nachträgliche Zugabe von 0,83 %iger Ammoniumchlorid-Lösung mit Tris-Puffer (pH: 7,2) zum Sediment und 15 minütiger Inkubation bei 37°C durch osmotischen Schock aufgelöst werden. Nach Zugabe der Ammoniumchlorid-Lösung und der Inkubation erfolgt eine Zentrifugation bei 350 g für 10 Minuten und ein zweimaliges Waschen der Zellen mit RPMI 1640 + 10 % FCS bei 280 g für jeweils 10 Minuten.

1.2. Anti-Ia-Globulin

Methoden der Anti-Ia-Globulin-Darstellung wurden von Billing, Terasaki et al. (9) und Humphreys, Strominger et al. (44) u. a. beschrieben. Als Antigen wurden von Billing et al. durch Papain abgebaute Milzzellmembranen von Patienten mit B-lymphozytärem Lymphom und von Humphreys entsprechend präparierte Zellmembranen der Zell-Linien IM-1 (humane B-lymphoblastozytäre Zellen) verwendet. Zur Gewinnung von Antikörpern wurde der flüssige, das Antigen enthaltende Zellmembranextrakt Kaninchen injiziert. Das von mir gegen Ia-Antigen verwendete Antiserum wurde von Alpha Gamma Laboratories, Kalifornien (Chargen-Nr.: 80311) bezogen.

Vor der Anwendung im Zytotoxizitäts- und Rosettentest wurde das Antiserum noch zweimal mit je ca. 5×10^9 JM-Zellen (36) nachabsorbiert, um Kreuzreaktionen mit anderen antigenen Determinanten als dem Ia-Antigen soweit wie möglich auszuschließen. Für die Absorption wurden die Jurkat-Zellen mindestens dreimal in physiologischer NaCl-Lösung bei 1700 g 10 Minuten zentrifugiert bis der Überstand klar erschien. Die gewaschenen Zellen wurden mit dem Antiserum jeweils eine Stunde bei einer Temperatur von $0^\circ - 4^\circ\text{C}$ inkubiert. Währenddessen wurde die Suspension mehrmals aufgeschüttelt. Nach der zweiten Inkubation wurde erneut für 15 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und anschließend das Antiserum abgehoben. Abschließend wurde das Antiserum in der Ultrazentrifuge bei 105 000 g während einer Zentrifugationsdauer von einer Stunde von Mikropartikeln gereinigt. Das danach im Überstand befindliche Antiglobulin wurde in beiden Testsystemen eingesetzt.

Der Proteingehalt des Antiserums betrug $3,2 \pm 0,1$ mg/ml.

1.3 Kaninchen-Normal-Immunglobulin

Um zu erfassen, ob und in welchem quantitativen Umfang Antikörper auf andere Art und Weise als die spezifische immunologische Bindung des Antikörpers an die Zelle angelagert werden, wurde Kaninchen-Normal-Immunglobulin als Kontrollserum eingesetzt.

Manche Kaninchen-Normal-Seren zeigen noch eine präformierte Kreuzreaktion mit menschlichen Zellen. Um diese auszuschließen, wurde das Kaninchen-Normal-Globulin vor Anwendung noch zweimal mit Human-Milz-Zellen absorbiert. Herstellung, Absorption und Isolierung der Globulinfraktion erfolgte nach dem bei Rodt (76) beschriebenen Verfahren.

Der Proteingehalt des Serums beträgt 10 mg/ml.

1.4. Bakterien

Die im Rosettentest verwendeten Bakterien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Leif Anderson, Universität Helsinki, zur Verfügung gestellt.

Der Staphylokokkus-aureus-Stamm Cowan I wurde nach der Methode von Landwall (57) bezüchtet. Diese spezielle Stamm zeichnet sich durch die Synthese von Protein A aus. Dieses Protein besitzt eine hohe Affinität zum Fc-Teil von IgG Antikörpern, so daß es im Falle einer Antigen-Antikörper-Reaktion zur Anlagerung der Bakterien kommt.

Die Bakterien wurden als ca. 10 %ige Suspension von RPMI 1640 mit 0,02 % Natriumazid-Zusatz bei 4°C aufbewahrt. Diese Suspension wurde auch in den Testsätzen verwendet.

2. Mikrozytotoxizitätstest

2.1. Beschreibung des Tests

Eine Antigen-Antikörper-Reaktion kann Komplement aktivieren. Nach Anlagerung der Antikörper an die Zellwand unter Komplementfixation kommt es zur enzymatischen Durchlöcherung der Zellmembran, zur Lyse der Zelle. Lebende und tote Zellen sind bei Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop durch ihr charakteristisches Aussehen zu unterscheiden.

Die Ausführung des Zytotoxizitätstest erfolgte in Anlehnung an die Methode von Mittal (65). Dabei werden 2 μ l der - wie in 1.1. beschrieben - vorbereiteten Zellen mit je 2 μ l der verschiedenen Antiserumverdünnungen für die Zeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellzahl war zuvor auf 2×10^6 Zellen/ml mit Medium (RPMI 1640 + 10 % FCS) eingestellt worden. Zellen und Antiserum werden mit einem Hamilton-Dispenser auf eine Terasaki-Platte pipettiert. Die Antiserumverdünnung erfolgt in Form einer logarithmischen Reihe, beginnend mit 1:2 bis zu einer Endverdünnung von 1:1024. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe werden je zehnmal z. B. 10 μ l Medium in Plastikmikroröhrchen vorgegeben und jeweils 10 μ l der vorhergehenden Antiserumverdünnung ins nächste Röhrchen transferiert und gemischt. Nach der Inkubation wird auf jedes Loch der Terasaki-Platte ein Tropfen Medium aufgetropft. Nach 10 Minuten wird das Medium so abgeschlagen, daß das Zellsediment dabei mit einer sehr geringen Restmenge des Mediums am Boden der einzelnen Vertiefung liegen bleibt. Daran anschließend setzt man 2 μ l Kaninchen-Komplement-Verdünnung mit dem Hamilton-Dispenser zu. Es erfolgt eine erneute Inkubation von 30 Minuten bei 37°C. Die Komplementverdünnung war in einem Vortest ermittelt worden. Hierbei wird bestimmt, welche Komplementmenge

einerseits optimale Titerstufen erbringt, andererseits selbst aber noch keinen zytotoxischen Effekt zeigt. Nach Ablauf der halben Stunde werden die Platten für 10 Minuten in den Kühlschrank gestellt und abschließend durch Auftropfen einer 5 %igen Formalin-Lösung (Verdünnung der 35 %igen Ausgangslösung mit physiologischer NaCl) fixiert. Um die Ausgangsvitalität der Zellen zu prüfen, wurde eine unbehandelte Kontrolle mit Zellsuspension gleichzeitig mit der übrigen Testreihe angelegt. Diese Kontrolle enthielt Zellsuspension mit dem oben genannten Medium in gleicher Menge von jeweils 2 μ l. Zu einer zweiten Kontrolle wurde zusätzlich noch 2 μ l Komplement gegeben, um einen zytotoxischen Effekt von Komplement allein auszuschließen.

2.2. Bewertungskriterien

Die Auswertung des Zytotoxizitätstest erfolgte im Phasenkontrastmikroskop. Lysierte Zellen erscheinen dabei dunkel, während vitale als hell-glänzend, nicht ent-rundet und ohne Läsion der Plasmamembran zu erkennen sind.

Insgesamt wurden für jeden Test ca. 200 - 300 Zellen pro Vertiefung in der Terasaki-Platte ausgezählt. Das Verhältnis von lysierten zu vorher eingesetzten Zellen wird in Prozent angegeben. Lag der Prozentsatz der lysierten Zellen in den Kontrollansätzen (Zellkontrolle, Komplementkontrolle) über 25 von Hundert, so wurde der Test als nicht auswertbar angesehen, weil eine Unterscheidung einer durch Antigen-Antikörper-Reaktion herbeigeführten spezifischen Lyse und unspezifischer Zellschädigung nicht mehr eindeutig möglich war. Abb. 1

zeigt den Kurvenverlauf bei einer starken Antigen-Antikörper-Reaktion dargestellt am Beispiel der Reaktion von REH-Zellen. Wenn es zu keiner Reaktion zwischen dem Antiglobulin, Komplement und dem zu testenden Antigen auf der Zellmembran gekommen ist, resultiert der ebenfalls in Abb. 1 dargestellte Kurvenverlauf, dargestellt am Beispiel der Reaktion von K 562-Zellen. Der Prozentsatz der lysierten Zellen wurde durch die Ermittlung des zytotoxischen Indexes korrigiert. Er berücksichtigt die Zell-Lyse in den zugehörigen Kontrollansätzen. Die Formel für den zytotoxischen Index wurde einer Arbeit von Espinouse (22) entnommen.

$$CI (\%) = \frac{\% \text{ lysierte Zellen mit Antiserum + Komplement} - \% \text{ lysierte Zellen in dem Kontrollansatz + Komplement}}{100 - \% \text{ lysierte Zellen in dem Kontrollansatz + Komplement}} \times 100$$

Der CI gibt den Prozentsatz der nur durch die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion lysierten Zellen an.

Um die Intensität der Reaktion bei den einzelnen Tests zu beschreiben, wird für die einzelnen Fälle folgender Bewertungsmaßstab angelegt:

0 - 29 % lysierte Zellen = Gruppe I, 30 - 59 % lysierte Zellen = Gruppe II, 60 - 100 % lysierte Zellen = Gruppe III. Die Reaktionsstärke des Antikörpers kann in Form des Log 2 Titters angegeben werden. Er gibt die erste Verdünnungsstufe, bei dem der Prozentsatz der lysierten Zellen deutlich abfällt, an. In den vorangegangenen Verdünnungsstufe ist ein deutlich höherer Prozentsatz toter Zellen festzustellen. In den verwendeten Tabellen bedeutet z.B. 7/100 %: Log 2 Titer: 7, CI: 100 %. Eine zugehörige Verdünnungsreihe könnte folgendermaßen ausgesehen haben:

Log 2 Titer:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnung:	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
Lysierte Zellen (%):	100	100	100	95	90	85	30	20	10	5

Die Bestimmung des Antiserumtiters setzt in der Regel einen hohen CI voraus, um den Reaktionsabfall sicher bewerten zu können.

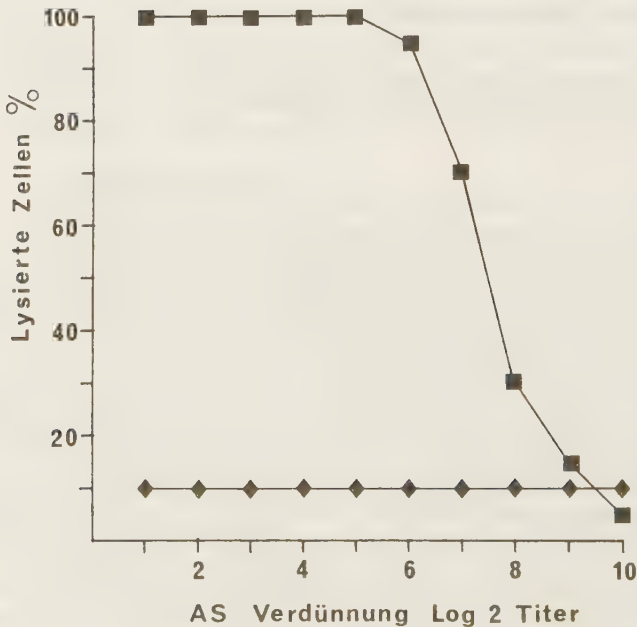


Abb. 1: Verhalten von REH-Zellen ■ und K 562-Zellen ♦ im Zytotoxizitätstest nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin.

3. Bakterienbindungstest

3.1. Beschreibung des Tests

Eine Antigen- Antikörper-Reaktion kann auch mit Protein A synthetisierenden Staphylokokken nachgewiesen werden. Diese Bakterien besitzen eine starke Affinität zum Fc-Teil von Antikörpern. Wenn es zu einer Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen auf der Zellmembran gekommen ist, lagern sich die Bakterien rosettenartig um die Zelle. Nach dem Anfärben von Zellen und Bakterien kann zusätzlich die Zellmorphologie beurteilt werden. Der Test wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach Gewinnung der Zellfraktion durch Ficoll-Isopaque-Dichtegradientenzentrifugation - wie in 1.1. beschrieben - werden die Zellen nochmals mit Medium (RPMI 1640 + bovine serum albumine (BSA)) und einem Zusatz von Natriumazid (2 g / 100 ml) bei 600 g für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellzahl mit Medium auf $3,5 - 4.0^6$ / ml eingestellt.

Ein Test besteht aus einem Dreifachansatz.

Zu je 100 µl Zellsuspension werden in das erste Reagenzglas (grad. 15 ml Spitzröhrchen) 10 µl Anti-Ia-Globulin, ins zweite 10 µl Kaninchen-Normal-Immunglobulin als Kontrolle gegeben. Der Proteingehalt des Kontrollansatzes mit Kaninchen-Normal-Immunglobulin wird durch Verdünnung mit Medium der im Anti-Ia-Globulin enthaltenen Globulinmenge angepaßt. Ein weiterer Kontrollansatz enthält nur Zellsuspension.

Alle drei Röhrchen werden für die Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis gelegt. Daran wird ein dreimaliger Waschvorgang mit je 2 ml Medium pro Ansatz für je 5 Minuten bei 600 g angeschlossen. Nach dem Abgießen des Überstandes verbleibt ein adhäsions-bedingter Flüssig-

keitsrückstand von ca. 200 - 300 μ l auf dem Bodensatz. Dazu werden 5 μ l Staphylokokkensuspension gegeben. Nach kräftigem Durchmischen auf einem Vortex-Mixer wird bei Zimmertemperatur für 30 Minuten unter zeitweiligem Schütteln inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 600 g für 5 Minuten werden die 200 - 300 μ l Flüssigkeit mit dem Hamilton Dispenser weitestgehend abgesaugt. Es folgt eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Um nicht spezifisch gebundene Bakterien möglichst gründlich zu entfernen, wird insgesamt dreimal für 5 Minuten bei 600 g mit 10 ml Medium pro Ansatz gewaschen, wobei ein besonders kräftiges Durchmischen mit Pasteur-Pipetten vor jeder Zentrifugation erforderlich ist. Nach der letzten Zentrifugation wird der Überstand abgegossen und Zellen samt Restflüssigkeit mit Medium auf 1 ml aufgefüllt. Die mit $3,5 - 4,0^6$ / ml gewählte Ausgangszellzahl erscheint besonders günstig, weil nach dem Auffüllen auf 1 ml eine Restzellzahl von ca. $3,0 \times 10^4$ Zellen / ml resultiert, die für die Zytozentrifugenpräparate als optimal angesehen wird. Der Zellverlust kommt durch die vielen Waschvorgänge zustande. 200 μ l der Zellsuspension werden nun in die Zytozentrifuge gegeben. Die Zentrifugation wird bei 800 RPM für 10 Minuten ausgeführt. Die Zytozentrifugenpräparate werden nach der Zentrifugation für 10 Minuten in gekühltem Methanol abs. fixiert. Die Zellen werden abschließend mit der panoptischen Färbung nach Pappenheim angefärbt.

3.2. Auswertung der Bakterienbindung

Bei jedem Präparat wurden ca. 200 - 300 Zellen mit Öl-immersion im Lichtmikroskop bezüglich ihrer Morphologie und ihrer Bakterienbindung beurteilt.

In Anlehnung an Gahmberg (26) wird eine rosettenartige Anlagerung von 5 Staphylokokken und mehr als spezifische Markierung angesehen (Abb. 2). Neben dieser Markierungsform konnten regelmäßig Zellen beobachtet werden, die wie mit Bakterien gespickt erscheinen (Abb. 3). Diese Zellen wurden als Bakterien phagozytierende Monozyten klassifiziert. Dieses Phänomen wurde in allen drei Ansätzen, sowohl mit Antiserum gegen Ia-Antigen als auch unspezifisch in den Kontrollen mit Kaninchen-Normal-Immunglobulin und alleiniger Zugabe von Bakterien bemerkt.

Die verschiedenen Formen der Markierung wurden für jeden Testansatz quantifiziert und in Prozent angegeben.

3.3. Modifikationen des Tests

3.3.1. Vergleich von Zytozentrifugen- und Ausstripräparaten

Um die am Ende des Verfahrens gewonnene Zellsuspension auf Objektträger aufzubringen, boten sich zwei Möglichkeiten an: entweder durch Zytozentrifugation, wobei Zellen und Medium getrennt und die Zellen fokussiert auf den Objektträger geschleudert werden, oder dadurch, daß ein Tropfen der Zellsuspension mit Hilfe eines Deckglases auf dem Objektträger ausgestrichen wird.

Beide Verfahren wurden miteinander verglichen. Dabei wurde so vorgegangen, daß von gleichen Testansätzen Zytozentrifugenpräparate und Ausstriche angefertigt wurden. Die Ausstrichtechnik wurde so gehandhabt, wie es bei der Anfertigung von Differentialblutbildern üblich ist (s.o.). Zytozentrifugenpräparate und Ausstriche wurden nach Pappenheim gefärbt. Bei der anschließenden Differenzierung konnte festgestellt werden, daß sich auf den Objektträgern mit der ausgestrichenen Zellsuspension lediglich eine sehr geringe

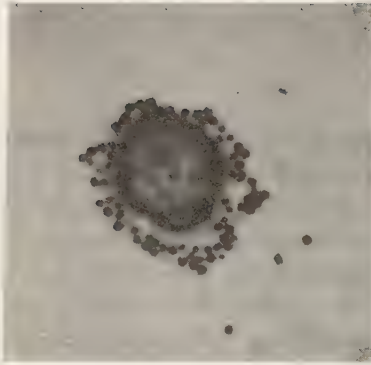


Abb. 2: Bakterienrosette. Die Abbildung zeigt einen Lymphozyten mit rosettenartiger Anlagerung von Bakterien.

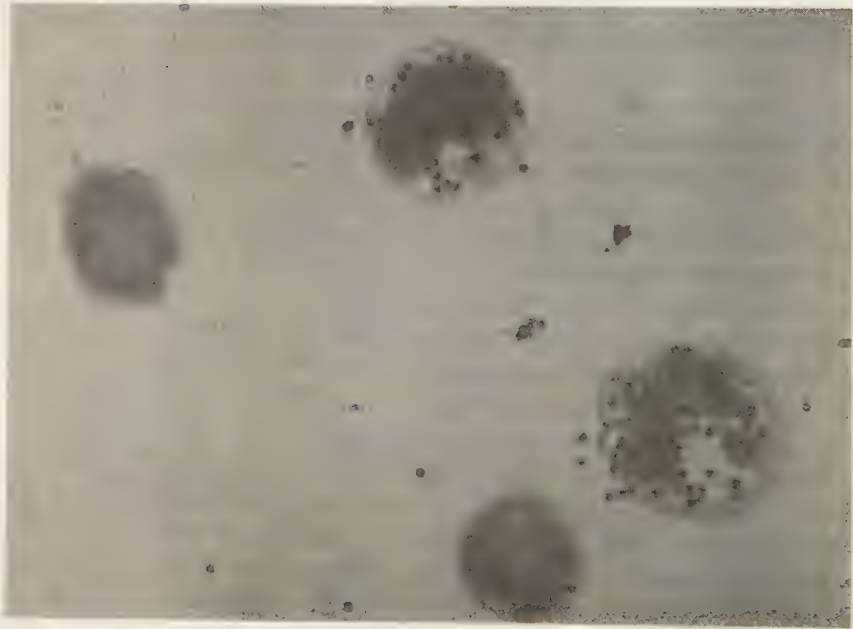


Abb. 3: Phagozytosephänomen: Neben zwei nicht markierten Lymphozyten sind zwei Bakterien phagozytierende Monozyten abgebildet.

Zahl von Zellen befand und eine repräsentative Quantifizierung markierte / nicht markierte Zellen somit nicht möglich war, während bei den Zytozentrifugenpräparaten die für die Auswertung zugrunde gelegte Mindestzahl von 200 - 300 differenzierten Zellen bei weitem überschritten wurde. Auch boten die Ausstriche keinerlei Vorteile in Hinblick auf deutlichere Markierung oder besseren Erhalt der Zelle und damit bessere Beurteilbarkeit der Morphologie.

Die Zytozentrifugation wurde somit als deutlich überlegene Methode bei den übrigen Versuchen angewendet.

3.3.2. Vergleich des Einflusses von fetalem Kälberserum oder Rinderserumalbumin als Zusatz zum Medium

In den ersten Versuchen wurde dem RPMI 1640 inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) zugefügt. Nachdem regelmäßig ein Zusammenklumpen der Zellen im Zytozentrifugenpräparat beobachtet werden konnte (Abb. 4), wurde dem Medium probeweise Rinderserumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 3,5 % zugefügt.

Es zeigte sich, daß danach die Zellen weitestgehend einzeln liegend auf dem Objektträger ausgebreitet waren. Dies konnte insbesondere für normale periphere Blutlymphozyten und viele Leukämiezellarten erreicht werden. Bei einigen Leukämiezellen und zum Teil Kulturzellen konnte auch damit eine Aggregation nicht vollständig verhindert werden, was möglicherweise den spezifisch veränderten Oberflächeneigenschaften der Zellen zuzuschreiben ist. Es wird vermutet, daß das Zusammenballen der Zellen mit angelagerten Bakterien über eine Bindung von IgG aus dem FCS an noch nicht besetzte Fc-Rezeptoren der Bakterien und ein an-

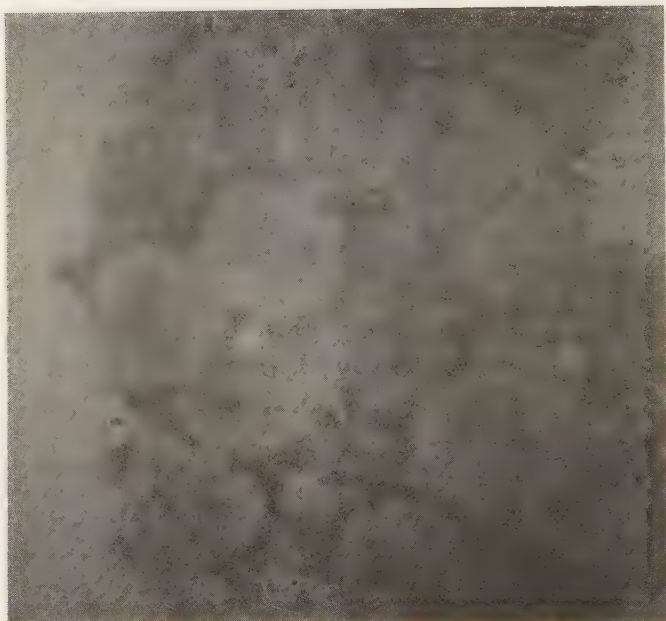


Abb. 4: Bakterienrosettentest mit FCS-Zusatz zum Medium. Gezeigt wird das Zusammenklumpen von Zellen (Prolymphozyten) bei Verwendung von FCS.

schließendes "bridging" der Bakterien untereinander zustande kommt (mündliche Auskunft, Dr. E. Thiel, Inst. f. Hämatol., München).

Obwohl eine Beurteilung auch noch bei dichter Zelllagerung möglich ist, wurde im Interesse einer erheblich erleichterten Ablesung bei allen folgenden Versuchen der Zusatz von BSA anstelle von FCS beibehalten.

3.3.3. Einfluß eines Natriumazid-Zusatzes

In den ersten Versuchen konnte beobachtet werden, daß die Bakterien sich im Falle einer positiven Antigen-Antikörper-Reaktion oft geballt an einer oder mehreren Stellen der Zelle angelagert oder sich dicht zusammengedrängt über einen Teil der Zelloberfläche gelegt hatten (Abb. 5). Dieses "capping"-Phänomen wurde bereits von Taylor (92) für Antigen-Antikörper-Reaktionen und ihren Nachweis im Immunfluoreszenztest beschrieben.

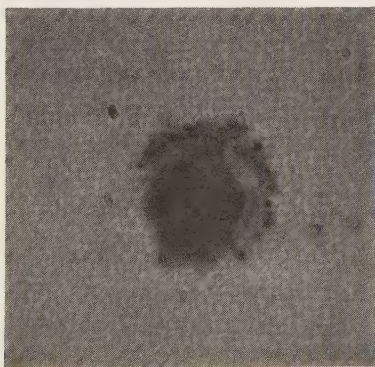


Abb. 5: "Capping"-Phänomen. Die Abbildung zeigt einen Lymphozyten mit haubenartiger Anlagerung von Bakterien bevor Natriumacid zugesetzt wurde.

Die "capping"-Erscheinung wird als ein mit dem Zell-metabolismus zusammenhängender, aktiver Prozeß betrachtet, der z. T. wärmeabhängig ist. Eine multivalente Bindung der Antikörper wird dafür verantwortlich

gemacht. Da dieses "capping" die Beurteilung der Zellmorphologie erschwert, wurde in Anlehnung an Taylor (92) dem Medium zusätzlich noch Natriumazid (2 g auf 1000 ml) zugefügt, das in der Lage ist, "capping" zu verhindern. Danach lagerten sich die Staphylokokken rosettenartig um die Zelle, falls es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion gekommen war. Zusammenlagerungen von Bakterien auf der Zelloberfläche wurden danach nicht mehr beobachtet und die Zelle blieb somit bezüglich ihrer Morphologie gut klassifizierbar.

3.3.4. Variation der Staphylokokkenmenge

Durch Zugabe von unterschiedlichen Staphylokokkenmengen sollte ermittelt werden, welche Mindestmenge an Bakterien eingesetzt werden muß, um eine eindeutige und spezifische Zellmarkierung zu erzielen.

Dazu wurden Staphylokokkenmengen von je 10 μ l, 20 μ l und 50 μ l der ca. 10 %igen Bakteriensuspension pro Versuchsansatz getestet. Es zeigte sich, daß bei 20 μ l und 50 μ l keine Markierungsverbesserung zu erzielen war, sondern sich lediglich die Menge der Bakterien erhöhte, die durch die einzelnen Waschvorgänge nicht entfernt werden konnte. Durch die erhöhte Staphylokokkenmenge im Zytozentrifugenpräparat wurde die Beurteilung der an der Zelle spezifisch oder unspezifisch gebundenen Bakterien erschwert.

Die beste spezifische Markierung ohne unspezifische Anlagerung und eine möglichst vollständige Entfernung der überschüssigen Staphylokokken durch die Waschprozeduren wurde mit 10 μ l Bakteriensuspension erreicht.

3.3.5. Veränderung der Inkubationszeit nach Bakterienzugabe

Um zu prüfen, ob die Ausbeute der mit Bakterien spezifisch markierten Zellen zu erhöhen war, wurde die Inkubationszeit nach Bakterienzugabe verlängert.

In Anlehnung an das von Gahmberg (26) publizierte Verfahren wurde zunächst eine Zeitspanne von 30 Minuten bei Raumtemperatur für die Inkubation angesetzt. Der Prozentsatz der mit Anti-Ia-Globulin markierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) betrug dabei 12,5 %. Nach Schlossmann (87) liegt die Menge der Ia-Antigen tragenden normalen PBL zwischen 15 und 25 %. Wenn nun nach der ersten 30 minütigen Inkubation unter wiederholtem Aufschütteln eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 600 g angeschlossen und die überschüssige Flüssigkeit mit dem Hamilton-Dispenser so weit wie möglich abgesaugt wird, so kann nach einer daran anschließenden weiteren Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur die Markierungsrate beim gleichen Spender auf 18,5 % erhöht werden. Dieser nunmehr im Normbereich liegende Wert legt nahe, daß mit dieser Variation der Methode eine Markierung nahezu aller Ia-positiven Zellen möglich ist.

3.3.6. Verwendung von unterschiedlichen Antiserumverdünnungen

Um die Antiserumkonzentration zu ermitteln, die die maximale Zahl von spezifisch mit Bakterien markierten Zellen erbringt, wurden verschiedene Antiserumverdünnungen hergestellt.

Die Endverdünnung des Antiserums mit Zellsuspension betrug in den einzelnen Versuchen 1:6, 1:11, 1:21, 1:41 und 1:81. Um eine Vergleichbarkeit sicherzustellen, wurden die Zellen für diese Testreihe vom gleichen Spender genommen. Bei der Verdünnung 1:6 zeigte sich ein deutliches Verklumpen der Zellen. Die Verdünnungen 1:11 und 1:21 lieferten eine einwandfreie Markierung, ohne daß die Zellen aggregierten. Alle höheren Verdünnungen reduzierten die Zahl der Zellen, die eine spezifische Bakterienbindung aufwiesen. Für alle weiteren Versuche wurde eine Serumverdünnung von 1:11 gewählt, um eine sichere Markierung ohne Klumpung zu erhalten,

3.3.7. Veränderung der Inkubationszeit nach Antiserumzugabe

In Analogie zur Verlängerung der Inkubationszeit nach dem Hinzufügen der Staphylokokkensuspension wurde geprüft, ob eine Verdopplung der Inkubationszeit nach Antiserumzugabe eine weitere Erhöhung der spezifisch markierten Zellen erbringen könnte.

Eine Inkubationszeit von 30 und 60 Minuten erbrachte jedoch identische Ergebnisse. Aus Zeitersparnis wurde daher die Inkubationszeit von 30 Minuten beibehalten.

3.3.8. Verwendung von Vollblut

Da die Blutproben vor dem Rosettentest einer zeitaufwendigen Abtrennung durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen werden mußten, wurde untersucht, ob eine Zellmarkierung auch bei Vollblut zu erreichen ist.

Dazu wurden im ersten Ansatz 1 ml heparinisiertes Vollblut mit 50 μ l Antiserum vermischt, im zweiten 1 ml des Blutes mit 50 μ l Kaninchen-Normal-Immunglobulin versetzt. Der dritte Ansatz blieb ohne Antiserum. Die weiteren Schritte unterschieden sich nicht von dem in 3.1. geschilderten Vorgehen. Nach dem Verwerfen des Überstandes im Anschluß an den letzten Waschvorgang wurden aus der verbleibenden Zellsuspension von jedem Ansatz mehrere Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Obwohl die Proben von Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie stammten und die Leukozytenwerte / μ l der einen Blutprobe bei ca. 30.000 Leukozyten und die der anderen um 50 000 Leukozyten lagen, war es nicht möglich eine genügende Anzahl markierter Zellen auszuzählen. Die Lymphozytenzahl in jedem der durchgemusterten Präparate überstieg in keinem Fall 30 Zellen. Grundsätzlich konnte jedoch eine Markierung der Ia-Antigen tragenden Zellen festgestellt werden. Die Erythrozyten störten die Beurteilung nicht. Da die Lymphozytenmenge in den Präparaten selbst bei relativ hohen Leukozytenwerten im peripheren Blut so gering war, und damit keine sichere Aussage über das Verhältnis positiver und negativer Zellen möglich war, wurde von der Verwendung von Vollblut Abstand genommen.

3,3,9. Testung von mit Komplement lysierten Zellen

Um den Einfluß der Vitalität der Zellen auf die Bakterienrosettenbildung abzuschätzen, wurde in Anlehnung an das Vorgehen im Zytotoxizitätstest eine Zell-Lyse mit Komplement durchgeführt.

Im Zytotoxizitätstest wird das Medium vor Zugabe der im Vortest ermittelten Komplementverdünnung abgeschlagen (siehe 2.1.). Danach bleibt eine nicht zu entfernende Restmenge von Medium in den einzelnen Vertiefungen zurück. Das Komplement wird durch den Mediumrückstand erneut auf schätzungsweise 1:2 verdünnt. Um mit Sicherheit nur lysierte Zellen für den Rosettentest zu bekommen, wurden deshalb Testansätze mit Komplementverdünnungen von 1:1,5, 1:2 und 1:3 gewählt. Die einzelnen Schritte des Zytotoxizitätstestes wurden übernommen. 100 µl der wie für den Rosettentest üblich vorbereiteten Zellsuspension wurden mit den der Verdünnung entsprechenden Komplementmengen versetzt. Nach der Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurden die Testansätze für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Medium für 5 Minuten bei 600 g. Die Bakterienzugabe und alle weiteren Schritte wurden wie in 3.1. geschildert ausgeführt. In der gleichen Testreihe wurde eine Kontrolle ohne Komplement mitgeführt. Die Zellvitalität wurde vor dem Test mit Trypanblau geprüft. Dabei wird Zellsuspension mit Trypanblaulösung (0,1 %ige Gebrauchslösung aus 1 %iger Stammlösung mit Aqua dest. verdünnt) im Verhältnis 1:2 gemischt und auf einem Vortex-Mixer nochmals gut durchgeschüttelt. Tote Zellen erscheinen bei Betrachtung im Lichtmikroskop blau, weil nach Schädigung der Zellmembran der Farbstoff in die Zelle eindringen kann.

Bei Auswertung der Testreihe zeigte sich kein Unterschied zwischen den vitalen Zellen des Kontrollansatzes ohne Komplement und den mit Komplement lysierten Zellen. Sowohl spezifische Rosettierung als auch Phagozytosephänomene konnten in beiden Fällen beobachtet werden. Der Rosettentest ist also im Gegensatz

zum Zytotoxizitätstest z. B. von der Zellvitalität weitgehend unabhängig.

4. Spontanrosettenbildung von Lymphozyten mit Hammelerythrozyten

1969 wurde zum erstenmal beobachtet, daß Lymphozyten in der Lage sind, Rosetten mit Hammelerythrozyten zu bilden, ohne daß die ersteren vorher Immunisierungsvorgängen unterworfen gewesen wären (3). Weitere Untersuchungen zeigten, daß nur T-Lymphozyten diese Eigenschaft besitzen (23, 50).

Nach der Methode von Jondal (50) werden gleiche Mengen Lymphozyten und Hammelerythrozytensuspension vermischt und bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an eine Zentrifugation (100 g) erfolgt eine erneute Inkubation bei 4°C. Dem vorsichtig aufgewirbelten Bodensatz wird Methylenblaulösung zugefügt. Die Auswertung erfolgt im Hämozytometer. Lymphozyten mit mehr als drei angelagerten Erythrozyten werden als Rosetten gezählt.

Es hat sich gezeigt, daß normale menschliche periphere T-Lymphozyten aus dem Blut, der Milz und Pleuraflüssigkeit Rosetten bei 4°C bilden, die aber bei 37°C dissoziieren, während normale Thymozyten und T-Antigen positive ALL-Blasten die Eigenschaft besitzen Rosetten zu bilden, die auch bei 37°C nicht dissoziieren (11).

5. Komplementbindungsreaktion

Antikörper können unter Komplementfixation an die Zellmembran angelagert werden. Dadurch entstehen Defekte in der Zellwand, und es kommt zur Lyse der Zellen. Das Komplementsystem besteht aus 11 Faktoren, die nach kaska-

denartiger Aktivierung zusammen mit dem Antikörper eine Perforation der Zellmembran bewirken und diese irreversibel schädigen.

Im Komplementbindungstest bestimmt man die Komplementmenge, die in der Lage war, die Zell-Lyse herbeizuführen. Die verbrauchte Komplementmenge ist dabei der Antikörpermenge in bestimmten Grenzen proportional. Da der Komplementverbrauch nicht sichtbar ist, wird ein Indikatorsystem zugesetzt. Es besteht aus sensibilisierten Schaferythrozyten, die in Konkurrenz zu den Testzellen treten. Falls sich auf den zu untersuchenden Testzellen das Antigen nicht befindet, mit dem die Antikörper reagieren könnten, so werden die entsprechend sensibilisierten Schaferythrozyten lysiert, was einem negativen Ausfall der KBR entspricht. Im Gegensatz dazu zeigt das Ausbleiben einer Hämolyse des Indikatorsystems eine positive KBR an. Der Testansatz erfolgt in Anlehnung an eine von Ringelmann beschriebene Methode unter Anwendung des Mikroliter-systems (75).

6. Immunfluoreszenztest

Eine weitere Methode, Antigen-Antikörper-Reaktion nachzuweisen, besteht darin, den Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie z. B. FITC (McKinney, 62) zu koppeln.

Bei dieser "direkten Methode" werden zur Markierung der Zellen gleiche Mengen von Lymphozytensuspension und markierte Antikörperverdünnung vermischt. Der einstündigen Inkubation schließen sich zwei Waschvorgänge an. Die Auswertung der Deckglaspräparate erfolgt in einem Zeiss-Universalmikroskop mit einer Auflichtfluo-

reszenzeinrichtung. Licht der Wellenlänge 490 nm ist in der Lage FITC selektiv zur Fluoreszenz zu bringen. Das Emissionslicht wird mit einem Interferenzsperrfilter für 520 nm ausgefiltert.

III. E R G E B N I S T E I L

1. Einführung

Eine Charakterisierung von Leukämien unter morphologischen Gesichtspunkten und mit Hilfe zytochemischer Reaktionen hat ihre Domäne bei myeloproliferativen Erkrankungen, die mit der Ausschüttung von reifen Zellstufen einhergeht. Unreife Zellformen sind von ihrer Morphologie her vielfach nicht sicher den einzelnen Leukämieformen zuzuordnen, und sie entziehen sich oft auch zytochemischen Nachweisen (18).

Für T-Zellen (thymusabhängige Lymphozyten und B-Lymphozyten (Bursa abstammende oder bone-marrow-Zellen)) konnte ein bestimmtes zytochemisches Muster von Befunden gefunden werden: so war eine schwache Reaktion der Sauren Phosphatase bei B-Zellen und eine starke Positivität bei T-Zellen zu bemerken, während sich die Zellen bei der PAS-Reaktion genau entgegengesetzt verhielten. Die positive PAS-Reaktion ist in Form von kleinen bis mittelgroßen zytoplasmatischen Granula nachweisbar (17). Auch bei c-ALL (common oder Null-ALL) fällt die PAS-Färbung positiv aus, während Pre-T- und T-ALL eine deutliche Reaktion mit Saurer Esterase aufweisen (94).

Zur Differenzierung zwischen lymphatischen und myeloischen Leukämien hat sich die Bestimmung der Peroxidase bewährt, da alle Zellreifungsstufen, die bereits eine Granulierung aufweisen eine peroxidase-positive Reaktion zeigen. Innerhalb der Myelopoese erscheinen also lediglich Myeloblasten negativ (6).

Für die Gruppe der lymphatischen Leukämien jedoch hat die Anwendung immunologischer Untersuchungsverfahren grundlegend neue Erkenntnisse erbracht, insbesondere da für B- und T-Zellen unterschiedliche Oberflächenmarker gefunden wurden, die eine weitere Aufschlüsselung besonders der akuten Leukämien erlaubten, die morphologisch häufig nur ein uniformes Bild mit blastoiden Zellen bieten.

Jede Differenzierungsstufe innerhalb der Myelo- und Lymphopoese kann wahrscheinlich Ausgangspunkt der leukämischen Proliferation sein. Die "target"-Zelle und alle aus ihr hervorgegangenen Zellen dieses pathologischen Zellklons weisen ein charakteristisches Muster von Oberflächenmarkern und/oder zytochemischen Befunde auf, das in vielen Fällen eine Zuordnung zu den einzelnen Zellreifungsstufen ermöglicht. Lediglich die Zellen der akuten undifferenzierten Leukämie (AUL) entzogen sich bisher allen Versuchen einer Einordnung unter hämatologischen und immunologischen Gesichtspunkten.

Der Nachweis von Ia-Antigen auf Leukämiezellen soll eine weiterführende Subklassifizierung der Leukosen ermöglichen. Bei der Besprechung der einzelner Ergebnisse wird folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wird kurz das klinische Bild der jeweiligen Leukämie referiert, anschließend werden die Ia-Antigen-Ausprägung und die Zuordnung zu den einzelnen Gruppen aufgrund der zytotoxischen Indices und die Ergebnisse der anderen immunologischen Markeruntersuchungen, soweit sie für die Diagnosefindung oder Differentialdiagnose von Bedeutung sind, dargestellt. Die Korrelation der Ia-Antigen-Ausprägung zu den Ergebnissen der anderen immunologischen Untersuchungen wird, wenn dies möglich ist, herausgearbeitet.

2. Zell-Linien

Vor Beginn der Untersuchung von Leukämien wurde Anti-Ia-Globulin mit Zellen von Zell-Linien auf seine Spezifität geprüft (Abb. 6).

Die im Zytotoxizitätstest untersuchten Zellen wurden lymphoblastoiden Suspensionskulturen entnommen. Die Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen bei 37°C in RPMI 1640 mit 10 %igem FCS- und Antibiotikazusatz gezüchtet, wie bei Rodt (76) beschrieben wurde. Bei den auf ihren Ia-Antigenen Besatz getesteten Zellen handelt es sich um die Linien MOLT 4, JM, REH, K 562, Daudi und IFH 16 (Staudte). Die Linien MOLT 4 wurde von Minowada et al. (64) und JM (Jurkat) von Schneider und Schwenk (87) etabliert. Bei beiden handelt es sich um Zellen mit T-Zell-Eigenschaften. REH (Ursprung: c-ALL) wurde von Rosenfeld et al. (88) etabliert. K 562 entstammt einer Philadelphia Chromosom positiven Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie und entwickelt erythrozytäre Vorläuferzellen. Sie wurde von Lozzio et al. (58) angezüchtet. Die Zell-Linie Daudi (Ursprung: Burkitt-Lymphom) wurde dem Institut von Dr. Reisenfeld, La Jolla, überlassen. Bei IFH 16 (Staudte) handelt es sich um eine lymphoblastoide Zell-Linie vom B-Zelltyp. Sie wurde am Hämatologischen Institut der GSF durch Infektion von Normal-Lymphozyten mit Epstein-Barr-Virus angezüchtet. Die Zell-Linien REH, IFH 16 und Daudi zeigten eine stark positive Reaktion, während MOLT 4, JM und K 562 keine Antigen-Antikörper-Reaktion mit Anti-Ia-Globulin aufwiesen. Bei menschlichen peripheren Blutlymphozyten liess sich eine spezifische, aber schwach ausgeprägte Reaktion nachweisen. Der zytotoxischen Index betrug 30 %. Die Ergebnisse des Mikrozytotoxizitätstest konnten durch die des Komplementbindungstest bestätigt werden.

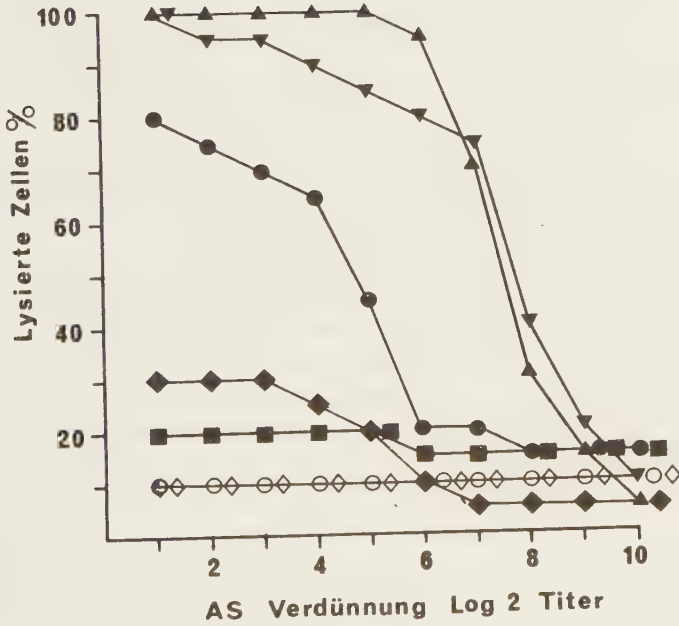


Abb. 6: Darstellung der Ia-Antigen-Ausprägung bei Zell-Linien und menschlichen peripheren Blutlymphozyten.
 ▲ REH, ▼ Staudte, ● Daudi, ■ Molt 4, ○ OK 562, ◇ JM, ◆ PBL (periphere Blutlymphozyten).

3. Übersicht über die untersuchten Leukämien

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen sich auf 121 Leukämiefälle.

Dabei wurden 55 Knochenmark-Blut-Proben, 93 Proben von peripheren Blutlymphozyten und ein Pleurapunktat untersucht.

Die Tests wurden ohne vorherige Kenntnisse der endgültigen immunologischen Klassifizierung ausgewertet.

Die nachfolgende Tabelle gibt Auskunft über die Fallzahl und die Anzahl von Knochenmark- und Blutproben bei den verschiedenen Leukämieformen.

Die aufgeführten Leukämiediagnosen beruhen auf den Ergebnissen der verschiedenen im Institut für Hämatologie der GSF, München, ausgeführten immunologischen Tests. Sie decken sich nicht in jedem Fall mit der Verdachtsdiagnose, unter der sie eingeschickt wurden und die anhand ausschließlich klinischer Parameter gestellt worden war.

Diagnose	Fallzahl	%	Anzahl Proben	
			KM	PBL
c-ALL:	33	27,3	23	25
c-ALL-Rezidive:	5	4,1	5	2
c/T-ALL*:	4	3,3	1	2
T-ALL:	8	6,6	5	4
Sézary-Syndrom:	1	0,8	0	1
CLL:	14	11,6	0	14
Prolymphozyten-Leukämie:	1	0,8	0	1
Haarzell-Leukämie:	2	1,6	0	2
AML/AMML:	9	7,4	4	7
CML:	1	0,8	1	1
BC bei CML:	17	14,0	4	15
AUL:	22	18,2	11	17
Megakaryozytäre Myelose:	2	1,6	0	2
KM infiltrierender Tu.:	1	0,8	1	0
	121	99,7	55	93

* In diesem Falle wurde zusätzlich ein Pleurapunktat untersucht.

Tab. 1: Übersicht über die Fallzahl und die Anzahl der untersuchten Knochenmark- und Blutproben bei den verschiedenen Leukämieformen

4. Bedeutung der Markerexpression für Klinik, Therapie und Prognose der akuten lymphatischen Leukämien

Bei akuten lymphatischen oder myeloischen Leukämien findet man charakteristischerweise eine Proliferation der einen oder anderen Zellreihe mit einer Verdrängung anderer Zellelemente im Knochenmark und im peripheren Blut, sowie eine Infiltration anderer Organe mit leukämischen Zellen.

Die Krankheit beginnt mit meist unspezifischen Beschwerden. Das Bild des weiteren Verlaufs wird durch die Manifestation der Leukämie in den entsprechenden Organen geprägt. Todesursache ist häufig die sich zunehmend ausprägende hämorrhagische Diathese oder nicht beherrschbare Infekte (6).

Die Prognose der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) galt bis zur Einführung von rigorosen zytostatischen Maßnahmen als absolut infaust. Mit Hilfe einer intensiven Chemotherapie kann heute in vielen Fällen wiederholt eine Remission, bisweilen sogar eine Heilung erreicht werden (74). In Fällen, wo es trotz der Therapie zu Rückfällen gekommen ist oder prognostisch mit konventioneller Behandlung keine Heilung mehr zu erwarten ist, eröffnet die Knochenmarkstransplantation mit vorausgegangener Chemo- und Radiotherapie die nochmalige Chance, erneut eine Remission zu erzielen (55,98)

Morphologie der Zellen und zytochemische Befunde führen zur Diagnose ALL. Immunologische Untersuchungen ermöglichen die weiterführende Klassifizierung in die verschiedenen Subtypen der ALL.

T-ALL werden häufig bei Jugendlichen über 18 Jahren und Erwachsenen angetroffen mit Bevorzugung des männlichen Geschlechts. Häufige klinische Zeichen sind Tumor im Mediastinum, hohe Leukozytenzahlen, lymph-

tische Ausbreitung und späte Infiltration des Knochenmarks. Die Prognose ist nach bisherigen Untersuchungen schlechter als die der "common type"- (non-T, non-B)-ALL. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, daß die T-ALL wiederum in verschiedene Untergruppen unterteilt werden kann, die eine jeweils unterschiedliche Prognose aufweisen (94). Die höchste Remissionsrate findet sich bei der c/T-ALL, einer Leukämie, die sowohl c-ALL-Antigen als auch T-Zell-Marker ausprägt, gefolgt von c-ALL, T-ALL und Pre-T-ALL (94).

Die seltene B-ALL befällt meistens Kinder und junge Erwachsene. In der Peripherie sind die Bereiche, in denen auch normalerweise B-Zellen vorkommen, infiltriert. Die Prognose ist verglichen mit der T- und Null-ALL am schlechtesten (95,7).

Die früher Null-ALL und heute als common-ALL (c-ALL) bezeichnete Leukämieform findet sich typischerweise im Kindesalter. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen. Das Knochenmark ist stark mit Leukämiezellen durchsetzt. Tastbare Lymphknotenschwellungen finden sich bisweilen, aber Prädilektionsstellen für eine Organmanifestation können nicht genannt werden. Im Vergleich mit T- und B-ALL hat diese Leukämieform die beste Prognose, wobei Kinder gegenüber Erwachsenen begünstigt sind (95,7).

4.1. c-ALL

Die immunologische Diagnose c-ALL kann dann gestellt werden, wenn die getesteten Zellen mit einem gegen c-ALL-Antigen gerichteten Antiserum im Immunfluoreszenztest, der Komplementbindungsreaktion oder im Zy-

totoxizitätstest eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion gezeigt haben.

Die Ergebnisse, die die Ia-Antigenausprägung betreffen, wurden im Zytotoxizitätstest gewonnen. Er ist, wie in 2.1. beschrieben, ausgeführt worden. Die Kriterien zur Bewertung der Ergebnisse wurden in 2.2. dargestellt. In Ergänzung werden die Ergebnisse der anderen Markeruntersuchungen wie Testung auf Erythrozytenrosetten, T-Antigen, Pre-T-Antigen, c-ALL-Antigen und Oberflächenimmunglobulin (SmIg) mitaufgeführt.

Bei 33 Fällen mit c-ALL wurden 23 Knochenmarksproben (KM) und 25 Proben aus peripherem Blut (PBZ) untersucht.

Insgesamt scheinen sich innerhalb der bisher als einheitlich angesehenen Gruppe der c-ALL vier Untergruppen abzuzeichnen:

18 Fälle wiesen eine stark positive Reaktion mit dem Anti-Ia-Globulin auf. Von 9 Patienten wurde KM und peripheres Blut, von 5 Patienten nur KM und von weiteren 4 Patienten wurden nur die PBZ getestet. Der zytotoxische Index lag zwischen 60 % und 100 %. Der Log 2 Titer schwankte zwischen 6 und 8. Bei diesen Fällen war außerdem lediglich eine positive Reaktion mit c-ALL-Antiserum zu verzeichnen. Alle anderen Markeruntersuchungen fielen negativ aus. Diese Fallgruppe zeigte also eine deutliche Ausprägung von Ia-Antigen und c-ALL-Antigen im KM und peripheren Blut.

Bei 5 Fällen (einmal PBZ und KM, zweimal KM, zweimal PBZ) lag bei der Untersuchung auf Ia-Antigen der zytotoxische Index zwischen 60 % und 95 % und der Log 2 Titer zwischen 6 und 8. Neben der positiven Reaktion mit c-ALL-Antigen war eine deutliche Reaktion mit Antiserum gegen Pre-T-Antigen sowohl im KM als auch im peripheren Blut zu bemerken. Die Ausprägung von Pre-T-Antigen wurde ebenfalls im Zytotoxizitätstest geprüft.

Die dritte Gruppe umfaßt 4 Patienten, bei denen je sowohl KM als auch PBZ getestet wurden. Es zeigte sich eine starke Reaktion mit Anti-Ia-Globulin im KM (zytotoxischer Index: 75 - 100 %, Log 2 Titer: 6 - 8), während die Zell-Lyse bei den Zellen im peripheren Blut zwischen 10 % und 45 % lag und kein Titer zu ermitteln war.

Bei 6 Patienten mit c-ALL konnte keine spezifische Zell-Lyse durch Anti-Ia-Globulin festgestellt werden. Untersucht wurden in einem Fall KM und PBZ, einmal KM, viermal PBZ. Der CI bei den PBZ betrug 10 - 30 %. Bei den Knochenmarksproben überschritt der CI 45 % nicht. Bei 4 der 6 Patienten lag eine aleukämische Verlaufsform der c-ALL vor.

c-ALL

Pat.	<u>E-Rosetten</u> bei 37°C		<u>T-Antigene</u> (Cytotox.)		<u>Pre-T-Antigene</u> (Cytotox.)		<u>c-ALL-Antigene</u> (Cytotox.)		<u>SmIg (Polyv.)</u>		<u>Ia-Antigene</u> (Cytotox.)	
			Log 2/Titer		Log 2/Titer		Log 2/Titer		PBZ	KM	Log 2/Titer	
	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM			PBZ	KM
E.S.	neg.	neg.	neg.	—	neg.	—	7/90%	—	neg.	—	7/95%	—
B.F.	neg.	—	neg.	—	neg.	—	4/65%	—	neg.	—	7/95%	—
T.E.	neg.	—	neg.	—	neg.	—	7/65%	—	neg.	—	7/65%	—
T.G.	—	neg.	—	neg.	—	neg.	—	5/65%	—	neg.	—	8/70%
R.S.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	7/50%	8/80%	neg.	—	8/65%	8/85%
A.F.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	8/90%	8/95%	—	—	7/95%	7/95%
Ma.L.	—	—	neg.	neg.	neg.	neg.	7/80%	7/65%	—	—	7/95%	7/100%
E.K.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	35%	7/60%	—	—	6/65%	7/95%
S.R.	—	neg.	—	—	—	—	—	(IF: +)	—	neg.	—	7/65%
D.S.	—	neg.	—	neg.	—	neg.	—	8/90%	—	neg.	—	8/95%
C.S.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	40%	6/95%	—	—	7/65%	6/90%
S.L.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	8/80%	6/70%	—	—	7/65%	6/95%
G.H.	neg.	—	neg.	—	neg.	—	6/80%	—	neg.	—	6/70%	—
M.G.	—	neg.	—	neg.	—	neg.	—	5/75%	—	—	—	5/70%
I.M.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	5/80%	9/90%	—	—	8/75%	7/95%
Mi.L.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	9/90%	8/85%	neg.	—	6/95%	7/95%
Y.K.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	7/80%	7/85%	—	—	8/60%	8/60%
Ha.G.	—	neg.	—	neg.	—	neg.	—	6/70%	—	—	—	5/60%
J.S.	—	neg.	—	neg.	—	5/95%	—	6/85%	—	neg.	—	7/70%
F.F.	neg.	neg.	neg.	neg.	4/95%	5/85%	5/65%	5/55%	neg.	—	7/80%	6/95%
W.G.	—	neg.	—	neg.	—	5/95%	—	7/80%	—	neg.	—	6/95%
C.L.	neg.	—	neg.	—	5/75%	—	7/70%	—	neg.	—	8/75%	—
K.G.*	neg.	neg.	neg.	neg.	7/80%	5/80%	60%	9/95%	neg.	—	60%	—
A.P.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	35%	7/70%	—	—	45%	6/75%
B.G.	neg.	neg.	neg.	—	neg.	—	30%	(IF: 90%)	neg.	—	45%	8/100%
S.A.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	40%	8/95%	neg.	—	40%	7/95%
C.O.	neg.	neg.	6/65%	neg.	neg.	neg.	55%	6/65%	neg.	—	10%	8/80%
A.S.*	neg.	neg.	neg.	—	6/65%	—	0%	(IF: 42%)	neg.	—	30%	—
Ha.G.	neg.	neg.	6/90%	neg.	neg.	neg.	10%	6/95%	—	—	10%	40%
M.L.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	10%	6/70%*	neg.	—	20%	—
P.D.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	25%	6/80%*	neg.	—	10%	—
S.M.	neg.	—	neg.	—	neg.	—	30% (IF: 53%)	—	neg.	—	20%	—
A.E.	—	neg.	—	neg.	—	neg.	—	60% (KBR: 1:32)	—	neg.	—	45%

Tab. 2: Ausprägung von Ia-Antigen in Relation zu anderen Markern bei c-ALL untersucht im Zytotoxizitätstest.

—: nicht getestet, IF: Immunfluoreszenztest, *:graphisch nicht dargestellt

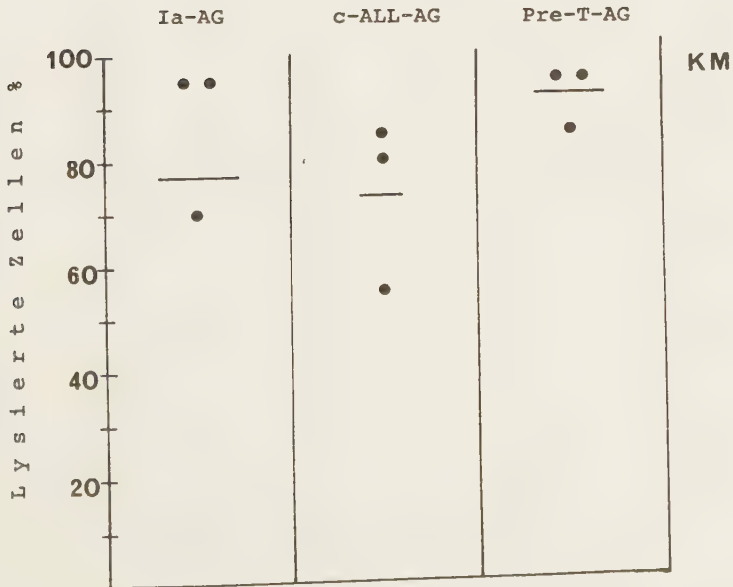
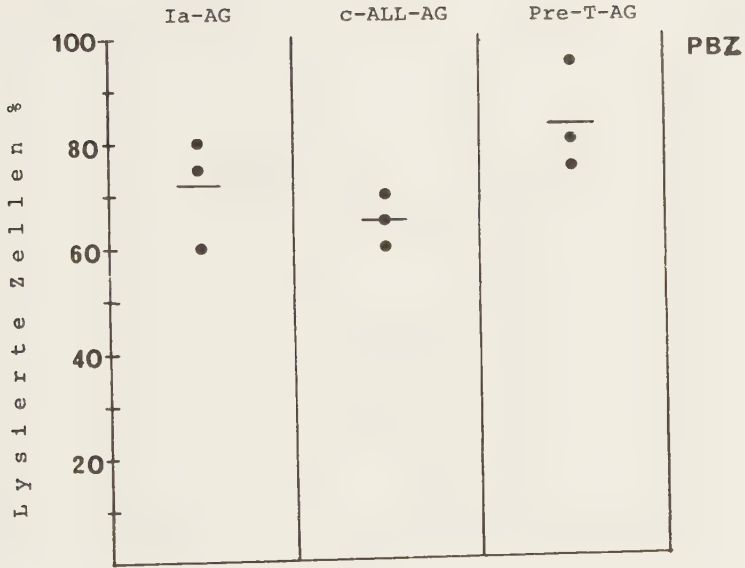


Abb. 7b: zeigt eine starke Markierung von KM-Zellen und PBZ mit Anti-Ia-Globulin, Anti-c-ALL-Globulin und Anti-Pre-T-Globulin.

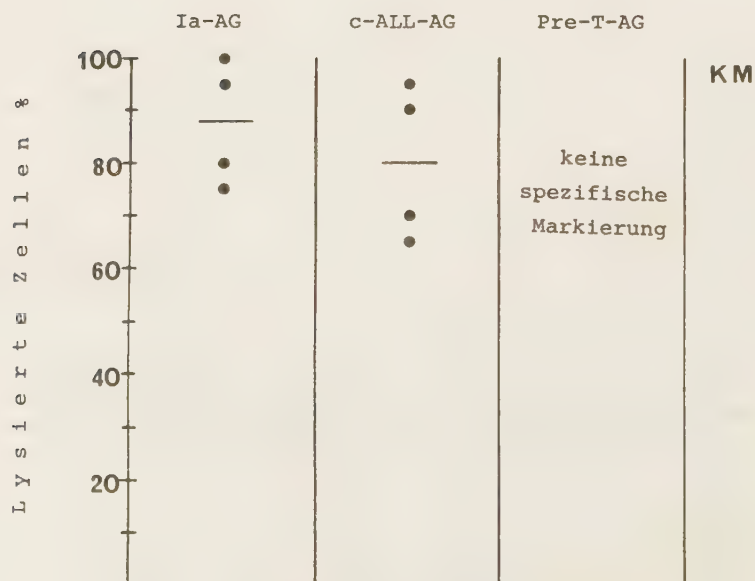
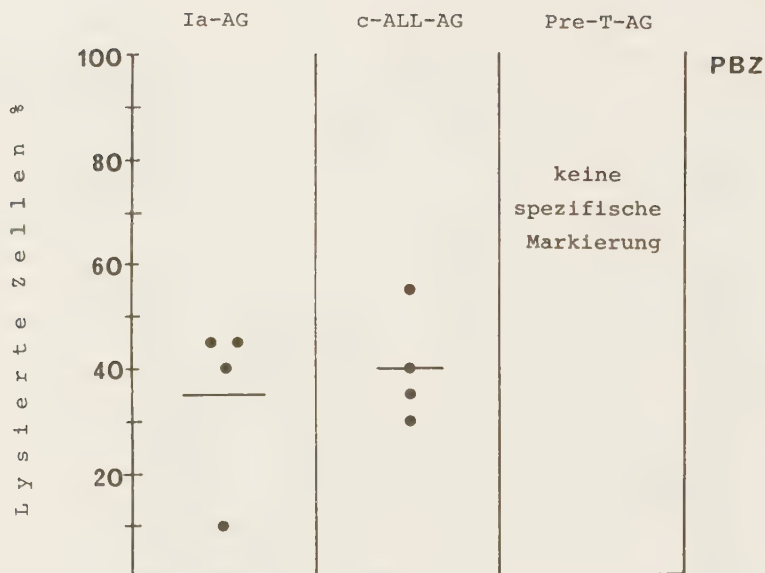


Abb. 7c: zeigt eine starke Ausprägung von Ia-Antigen und c-ALL-Antigen im KM gegenüber einer schwachen Markierung bei PBZ. Es war keine Reaktion mit Anti-Pre-T-Globulin zu verzeichnen.

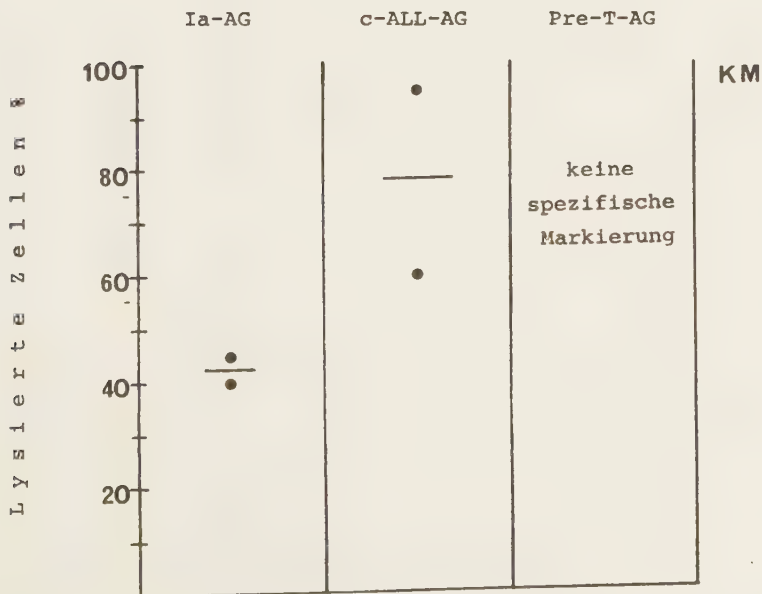
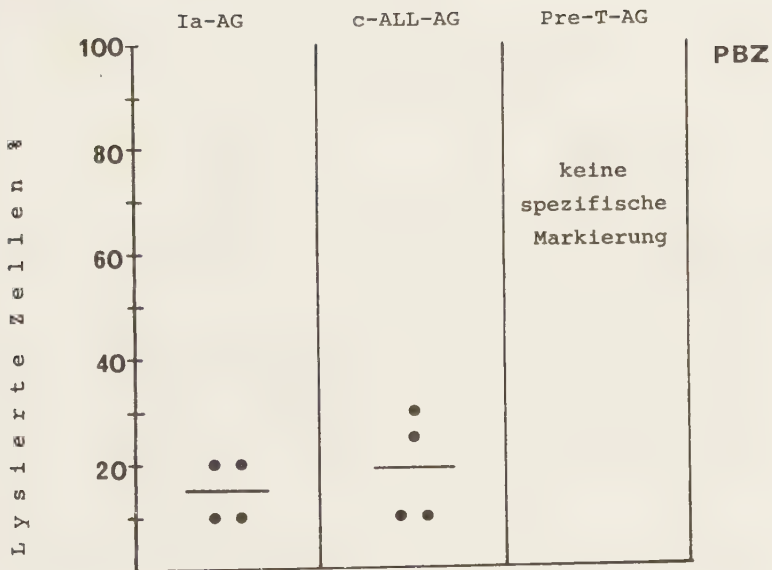


Abb. 7d: zeigt eine unspezifische Markierung von KM-Zellen und PBZ mit Anti-Ia-Globulin und die hohe c-ALL-Antigen-Ausprägung im KM, PBZ wurden nur geringgradig mit Anti-c-ALL-Antigen markiert.

4.2. c-ALL-Rezidive

Von 5 Fällen mit Rezidiven einer c-ALL wurden zweimal PBZ und KM, bei den verbleibenden drei Patienten nur das KM untersucht.

Der zytotoxische Index lag zwischen 65 und 100 %, der Log 2 Titer zwischen 6 und 8. c-ALL-Antigen wurde im zytotoxischen Test und/oder mit dem Immunfluoreszenztest nachgewiesen. Pre-T-Antigen fand sich in zwei Fällen. Außer den genannten waren alle anderen Oberflächenmarker negativ.

Man findet also bei den Rezidiven einer c-ALL das gleiche Markermuster wie beim ersten Auftreten einer c-ALL. Die Fälle mit c-ALL-Rezidiven können in die für die c-ALL gebildeten Gruppen eingegliedert werden.

c-ALL-Rezidive

Pat.	<u>E-Rosetten</u> bei 37°C		<u>T-Antigen</u> (Cytotox.) Log 2/Titer		<u>Pré-T-Antigen</u> (Cytotox.) Log 2/Titer		<u>c-ALL-Antigen</u> (Cytotox.) Log 2/Titer		<u>SmIg</u>	<u>Ia-Antigen</u> (Cytotox.) Log 2/Titer	
	PB2	KM	PB2	KM	PB2	KM	PB2	KM	PB2	KM	KM
R.K.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	55%	40% (IF:74%)	—	7/90%	7/100%
H.Ü.	neg.	neg.	neg.	neg.	4/80%	5/95%	8/85%	9/95%	neg.	6/85%	6/95%
M.S.	—	neg.	—	neg.	—	4/95%	—	5/90%	—	—	8/100%
M.V.	—	neg.	—	neg.	—	neg.	—	6/70%	—	neg.	7/75%
S.D.	—	—	—	neg.	—	neg.	—	8/95%	—	—	65%

Tab. 3: Ausprägung von Ia-Antigen in Relation zu anderen Markern bei c-ALL-Rezidiven untersucht im Zytotoxizitätstest.

—: nicht getestet, IF: Immunfluoreszenztest

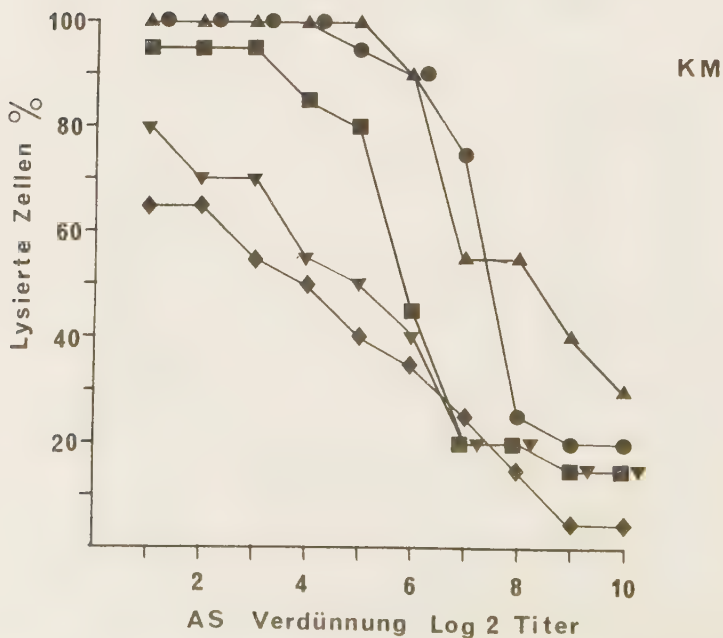
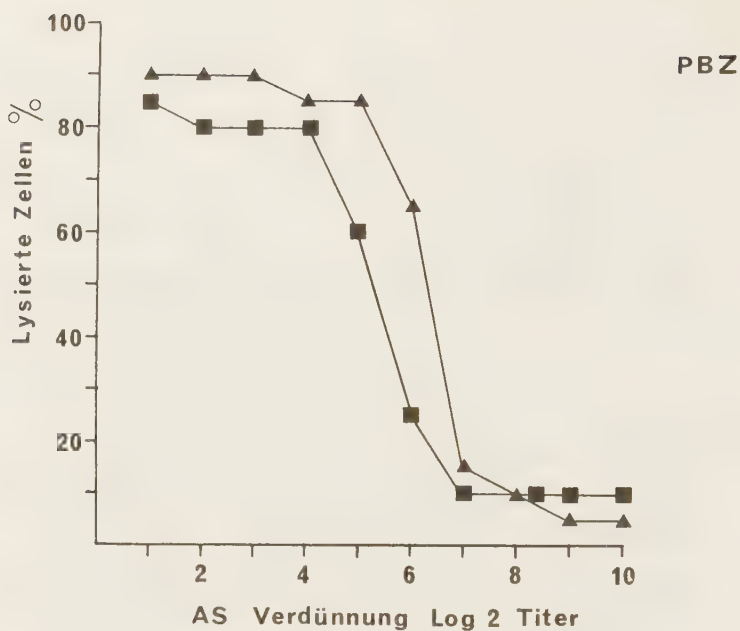


Abb. 8: Reaktivität von Anti-Ia-Globulin gegen Zellen von 5 c-ALL-Rezidiv-Patienten untersucht im Zytotoxizitätstest.
(Patienten: ▲R.K., ■H.Ü., ●M.S., ▼M.V., ◆S.D.)

4.3. c/T-, T-ALL

4 Fälle mit c/T-ALL (2 PBZ, 1 KM, 1 Pleurapunktat) und 8 Fälle einer T-ALL (4 PBZ, 5 KM) wurden auf Ia-Antigen Ausprägung untersucht.

Wie Tab. 4 zeigt, war bei den Patienten mit c/T-ALL c-ALL-Antigen nachweisbar. Pre-T- und T-Antigen waren bei zwei Patienten stark positiv, bei den beiden anderen schwächer ausgeprägt. E-Rosetten wurden nicht gebildet.

Bei den T-ALL konnte c-ALL-Antigen nicht mehr nachgewiesen werden, während eine deutliche Markierung der Zellen durch E-Rosetten bei 37°C, T-ALL-Antigen und Pre-T-Antigen im zytotoxischen Test möglich war.

Es konnte bei keiner Probe eine positive Reaktion mit Anti-Ia-Globulin festgestellt werden.

c/T-ALL / T-ALL

Pat.	E-Rosetten (bei 37°C)		T-Antigen		Pre-T-Antigen		c-ALL-Antigen		SmIg (Polyval.)		Ia-Antigen	
	(Cytotox.test: (Cytotox.test: (Cytotox.test:		Log 2 Titer/CI)Log 2 Titer/CI)Log 2 Titer/CI)		Log 2 Titer/CI)Log 2 Titer/CI)		Log 2 Titer/CI)		Log 2 Titer/CI)		(Cytotox.test)	
	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM
A.A.	neg.		55	—	50	—	25 37%*	—	—	—	25	—
M.S.	neg.		35	—	5/80	—	neg.	70%*	9%		0	—
I.S.	—	neg.	—	7/90	—	7/95	—	6/90	—	3%	—	20
W.H. Pleurapunkt.	20 %		8/90		6/95		6/65		—		0	
S.S.	85%	—	5/95	—	35	—	neg.	—	—	—	0	—
O.L.	—	68%	—	8/95	—	7/95	—	neg.	—	0,5%	—	0
L.M.	—	52%	—	9/95	—	9/95	—	(+)	—	neg.	—	10
S.H.	27%	43%	7/85	7/95	6/85	7/95	neg.	neg.	53%		0	—
A.P.	91%	—	7/95	—	5/95	—	neg.	—	—	—	0	—
M.D.	—	78%	—	6/75	—	7/75	—	neg.	—	neg.	—	5
D.R.	—	65%	—	8/100	—	7/95	—	neg.	—	2%	—	10
E.T.	31%		35	55	5/60	5/80	neg.	neg.	3%		0	5

Tab. 4: Ausprägung von Ia-Antigen bei c/T-ALL und T-ALL in Relation zu anderen Markern untersucht im Zytotoxizitätstest.

* Immunfluoreszenztestwert, —: nicht getestet

4.4. Akute undifferenzierte Leukämien (AUL)

Bei 22 Fällen von AUL ergaben sich drei Gruppen bezüglich der Ia-Antigen-Ausprägung.

Bei einer Gruppe von 9 Patienten konnte keine Antigen-Antikörper-Reaktion festgestellt werden.

Bei einer weiteren mit 5 Patienten lag der zytotoxische Index zwischen 45 und 55 % im Knochenmark und zwischen 30 und 50 % für PBZ. Lediglich einmal zeigt sich eine Diskrepanz zwischen KM- und PBZ-Befund. Für die PBZ konnte hier ein zytotoxischer Index von 20 % ermittelt werden, während er im KM 45 % betrug.

Die dritte Gruppe umfaßte 8 Fälle. Bei allen ergab sich eine stark positive Markierung sowohl im Knochenmark als auch für periphere Blutlymphozyten.

Andere immunologische Marker konnten in keinem Fall sicher nachgewiesen werden. Die in Tab. 5 positiven Reaktionen waren in der Gesamtbeurteilung mit zytochemischen Befunden und Morphologie der Zellen nicht ausreichend überzeugend, um die Diagnose AUL zu ändern. Sie könnten allenfalls eine beginnende Differenzierung in Richtung auf eine myeloische oder lymphatische Leukämie andeuten.

A U L

Patient	<u>Ia-Ag</u>		<u>Andere Marker</u>	
	PBZ(Log2 Titer/CI)	KM(Log2 Titer/CI)	PBZ	KM
M.F.	7/90	—	Myel. Ag: 1:32*	—
Ka.K.	8/90	—	Myel. Ag: 7/90 ⁺ , Pre-T-Ag: 4/95 ⁺ , c-ALL-Ag: 22 %*	—
M.R.	7/65	8/80	∅	∅
An.K.	7/80	—	∅	—
S.R.	6/95	—	∅	—
S.G.	8/90	7/90	Pre-T-Ag: 4/90 ⁺	Pre-T-Ag: 4/85 ⁺
			c-ALL-Ag: 28 %*	
C.L.	—	8/100	—	∅
D.O.	7/100	—	∅	—
J.C.	40	45	∅	∅
J.B.	30	55	∅	∅
H.K.	50	50	∅	∅
Kl.K.	—	40	—	c-ALL-Ag: 50 %*
K.P.	20	45	∅	∅
G.S.	0	—	T-Ag: 7/60 ⁺	—
M.T.	10	—	T-Ag: 4/65 ⁺	—
U.S.	5	—	Pre-T-Ag: 6/70 ⁺	—
Ad.K.	0	—	∅	—
M.F.	—	15	—	Pre-T-Ag: 6/85 ⁺
M.B.	25	—	Myel. Ag: 6/60 ⁺	—
K.M.	0	—	Myel. Ag: 7/80 ⁺ , Pre-T: 6/90 ⁺	—
K.H.	—	0	—	∅
A.S.	—	20	—	∅

Tab. 5: Oberflächenmarker bei AUL.

Ia-Antigen: Ausprägung des Antigens im Zytotoxizitätstest

Andere Marker: Nachweis von Antigenen in unterschiedlichen Testsystemen

(* Zytotoxizitätstest, * Immunfluoreszenztest, 0 KBR)

∅ keine Markerausprägung, — nicht getestet

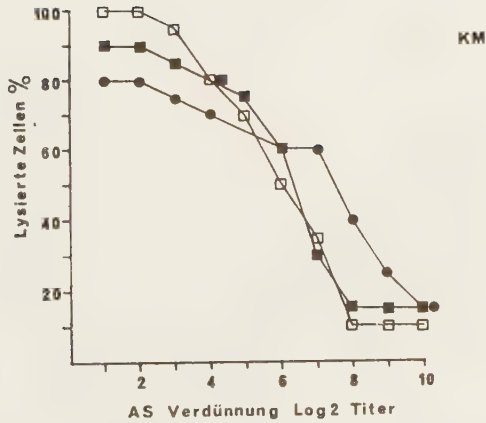
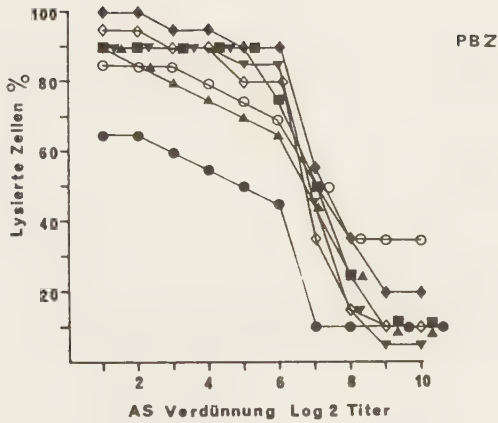


Abb. 9: Ia-Antigen-Ausprägung auf Zellen von Patienten mit AUL.
 Abb. 9a: Die Abbildung zeigt eine starke Markierung der Zellen mit Anti-Ia-Globulin (Gruppe III).

Obere Abb.: Patienten: ▼M.F., ▲Ka.K., ●M.R., ○An.K., ◇S.R.,
 ■S.G., ◆D.O.

Untere Abb.: Patienten: ●M.R., ■S.G., □C.L.

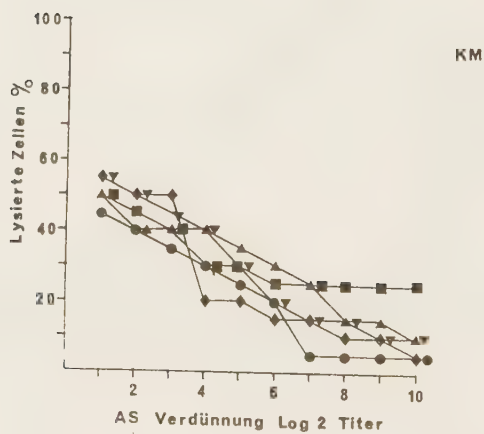
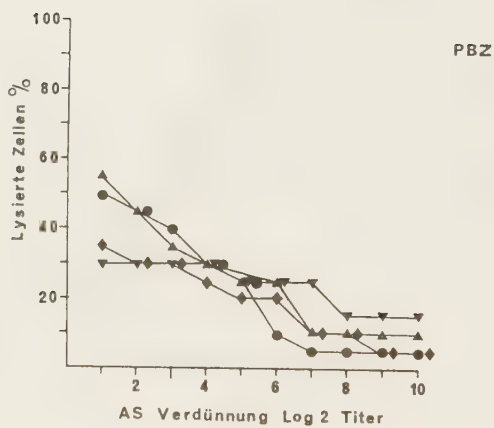


Abb. 9b: Die Abbildung zeigt eine mittelgradige Markierung der Zellen mit Anti-Ia-Globulin (Gruppe II).

Obere Abb.: Patienten: ●J.C., ◆J.B., ▲H.K., ▼K.P.

Untere Abb.: Patienten: ●J.C., ◆J.B., ▲H.K., ▼K.P., ■Kl.P.

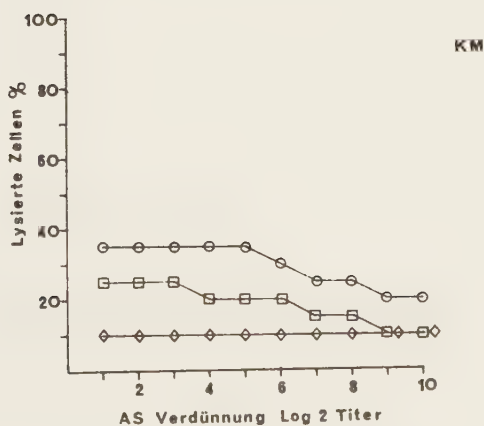
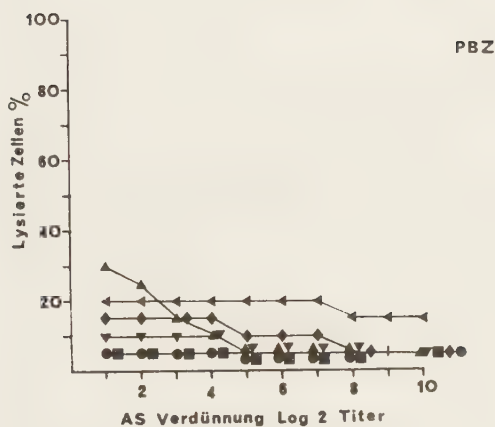


Abb. 9c: Die Abbildung zeigt eine schwache Markierung der Zellen mit Anti-Ia-Globulin (Gruppe I).

Obere Abb.: Patienten: ▲ G.S., ◆ M.T., ▼ U.S., ● Ad.K., ■ K.M., △ M.B.
 Untere Abb.: Patienten: □ M.F., ◇ K.H., ○ A.S.

5. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die chronisch lymphatische Leukämie ist durch eine pathologische monoklonale Vermehrung lymphatischer Zellen im peripheren Blut, Lymphgeweben und anderen Organen gekennzeichnet. Uncharakteristische Beschwerden leiten die Erkrankung ein, die sich über etliche Jahre erstrecken kann. Je nach Organbefall können die verschiedensten Beschwerden und klinischen Bilder resultieren.

Im Blutbild sieht man zunächst eine mäßige Lymphozytose, die im Verlauf der Zeit zunimmt und andere zelluläre Elemente allmählich verdrängt. So finden sich mit Fortschreiten der Erkrankung eine zunehmende Anämie und Thrombozytopenie. Die Lymphozyten erscheinen als kleine, reife Zellen. Pathognomonisch für diese Erkrankung sind Gumprecht'sche Kernschatten.

Als zytochemische Untersuchungen bieten sich der Nachweis der PAS-Reaktion und eine spezielle Nuleolenfärbung an (6).

Charakteristische immunologische Befunde sind die spontane Bindung von Mäuseerythrozyten, die von Lymphozyten in Form von Rosetten angelagert werden, der Besatz mit Oberflächenimmunglobulinen (SmIg), sowie Fc- und Komplement-Rezeptoren. Die Monoklonalität der Zellen kann mit Antiseren gegen leichte Ketten vom kappa- oder lambda-Typ nachgewiesen werden. Überwiegend liegen B-zell-Formen vor. T-CLL können nur in sehr seltenen Fällen angetroffen werden (33).

Bei 14 Fällen von chronisch lymphatischer Leukämie wurden periphere Blutzellen auf ihre Markerausprägung getestet.

Bei 11 Patienten wurden Mäuseerythrozytenrosetten, bei

C L L

Pat.	Mäuseerythrozyten (%)	Fc-Rezeptoren (%)	Ig-polyvalent (%)	IgG (%)	IgM (%)	IgD (%)	Leichtkettentyp kappa (%)	Leichtkettentyp lambda (%)	Ia-Antigen Log 2 Titer/CI (%)
J.S.	72	55	—	24	64	neg.	pos.	neg.	8/100
F.M.	—	14	59	4	7	neg.	22	neg.	8/85
I.G.	67,5	34	20	41	32	neg.	0	31	8/80
G.B.	9	19	14	—	—	—	—	—	7/100
A.M.	3,5	29,5	72	neg.	19	neg.	22	neg.	7/95
M.S.	32	14	14,5	neg.	18	neg.	neg.	neg.	7/95
A.D.	0	29	23	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	7/90
F.H.	49	25	28	—	28	neg.	neg.	29	7/90
? R.	—	—	—	—	—	—	—	—	7/85
H.H.	11,5	18	16	5	neg.	neg.	—	—	7/70
Kl.S.	60	31,5	21,5	12	34	neg.	—	—	6/95
M.P.	57	10	13	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	6/85
F.S.	79	71,5	30	neg.	25	—	21	neg.	6/80
Ka.S.	58,5	62,5	38	—	43	neg.	18	22	6/65

Tab. 6: Ausprägung von Ia-Antigen auf CLL-Zellen untersucht im Zytotoxizitätstest.
Andere Marker wurden zur ERGänzung mitaufgeführt.

—: nicht getestet

7 leichte Ketten vom kappa- oder lambda-Typ nachgewiesen, die als Teile des Ig M-Moleküls identifiziert werden konnten. Sämtliche immunologischen Befunde sprachen dafür, daß es sich in allen Fällen um B-CLL handelt. Ein Patient (R.) wurde ohne aktuelle Markerwerte als klinisch und immunologisch gesicherte B-CLL in die Tabelle übernommen. Bei Testung der Zellen auf Ia-Antigen konnte eine starke Ausprägung in allen Fällen beobachtet werden. Außer bei einem Patienten (Ka.S., CI: 65 %) lag der Prozentsatz der Zell-Lyse bei allen anderen zwischen 80 % und 100 %. Der Log 2 Titer schwankte zwischen 6 und 8.

6. Akute myelo-monozytäre Leukämien (AMML)

Für die akute myelo-monozytäre Leukämie gilt bezüglich des Krankheitsbeginns und der klinischen Manifestation das bereits für akute lymphatische Leukämien Gesagte.

Im Blutbild können akute Leukämien vom myeloblastären, vom promyelozytoiden und vom monozytoiden Typ unterschieden werden. Übergänge zwischen den einzelnen Formen sind möglich. In jedem Fall kann jedoch ein relativ uniformes Zellbild angetroffen werden. Eine eindeutige Zuordnung der Zellen ist nicht in jedem Fall möglich. Zytoplasmatische Einschlüsse bei Myeloblasten und Promyelozyten, Auer-Stäbchen, können bei AMML gefunden werden, können aber nicht als absolut sicheres Indiz für diese Erkrankung angesehen werden. Häufig ist eine eindeutige Zuordnung zur myeloischen oder lymphatischen Reihe aufgrund des morphologischen Bildes allein nicht möglich. Neben anderen Untersuchungen hat sich besonders der Peroxidase-Nachweis als geeignet erwiesen, um myeloische Zellen zu identifizieren (6).

Grundlage der immunologischen Diagnostik ist eine Testung gegen myeloische Zellen. Bei der Untersuchung von 9 Patienten mit AMML wurden myeloische Antigene in 6 Fällen durch den Zytotoxizitätstest, in einem anderen durch den Immunfluoreszenztest und in einem weiteren durch den Komplementbindungstest nachgewiesen. Nur bei einem Patienten (I.K.) konnte die Diagnose lediglich aufgrund der positiven Peroxidase-Reaktion gestellt werden.

Bei der Testung auf Ia-Antigen-Ausprägung konnten drei Gruppen gebildet werden:

1. Die Zellen von zwei Patienten (1 KM, 1 PBZ) zeigten eine stark ausgeprägte Reaktion mit Anti-Ia-Globulin (CI: 85 % und 75 %, Log 2 Titer: 7 und 4).
2. Bei weiteren drei Patienten (1 KM + PBZ, 1 KM, 1 PBZ) konnte eine spezifische Markierung festgestellt werden, ohne daß ein sicherer Titer ermittelt werden konnte (CI: 40 % - 55 %). Bei dem einen Fall, bei dem sowohl KM als auch PBZ getestet wurden, ließ sich kein Unterschied im Verhalten der Knochenmark- und peripheren Blut-Zellen bemerken.
3. Bei der dritten Patientengruppe, die vier Fälle umfaßt (1 KM + PBZ, 3 PBZ), betrug die Zell-Lyse maximal 20 %. Es konnte somit kein Ia-Antigen sicher nachgewiesen werden.

	<u>A M M L</u>		
	Ia-Antigen		Myeloische Antigene
Pat. (Cytotoxizitätstest)			
	PBZ	KM	PBZ/KM
M.H.	7/85 %	—	8/85 % ⁺
M.G.	—	4/75 %	6/65 % ⁺
A.E.	55 %	—	6/60 % ⁺
M.Ö.	45 %	40 %	1:32 [°]
L.E.	—	40 %	6/60 % ⁺
R.S.	0	—	7/85 % ⁺
K.G.	5	—	7/90 % ⁺
C.K.	5	5	90 %*
I.K.	0	—	POX: +

Tab. 7: Ausprägung von Ia-Antigen und myeloischen Antigenen bei AMML.

⁺Cytotoxizitätstest, *Immunfluoreszenztest,
[°]Komplementbindungsreaktion, POX: Peroxidase-Reaktion, —: nicht getestet

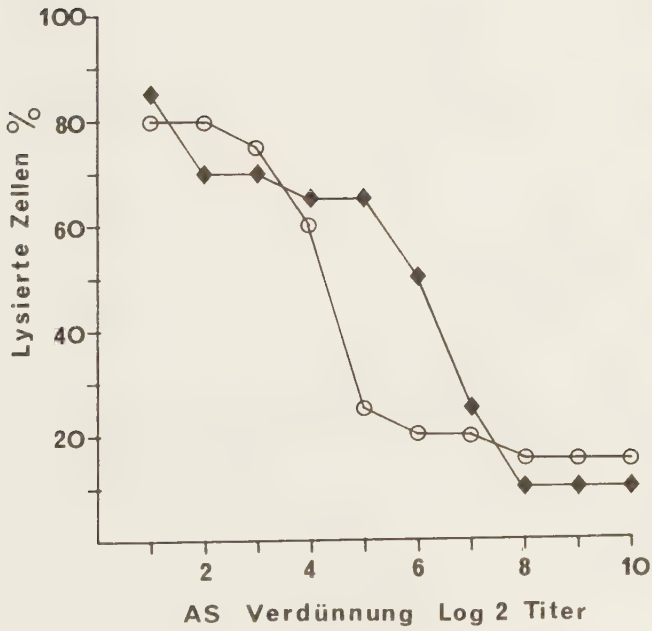


Abb. 10a: Hohe Ia-Antigen-Ausprägung bei Patienten mit AMML.

Patienten ◆ M.J. (PBZ), ○ M.G. (KM)

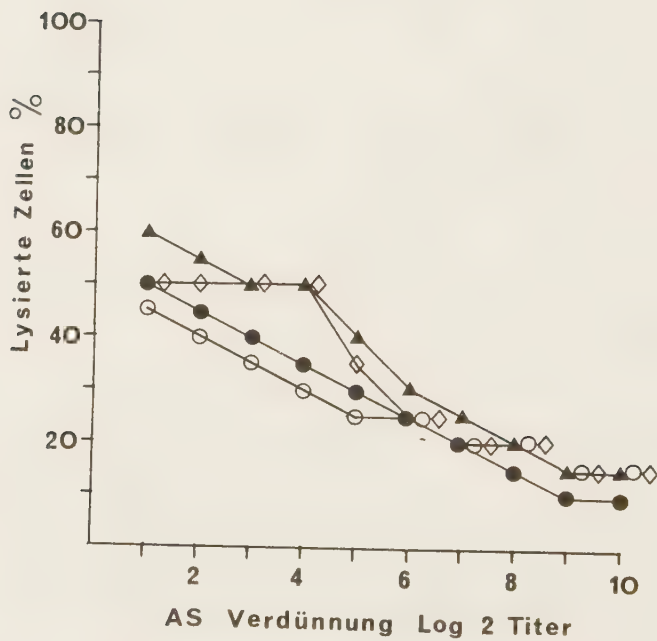


Abb. 10b: Mittelgradige Ia-Antigen-Ausprägung bei Patienten mit AMML.

Patienten: ▲A.E. (PBZ), ●M.Ö. (PBZ), ○(KM),
◇L.E. (KM)

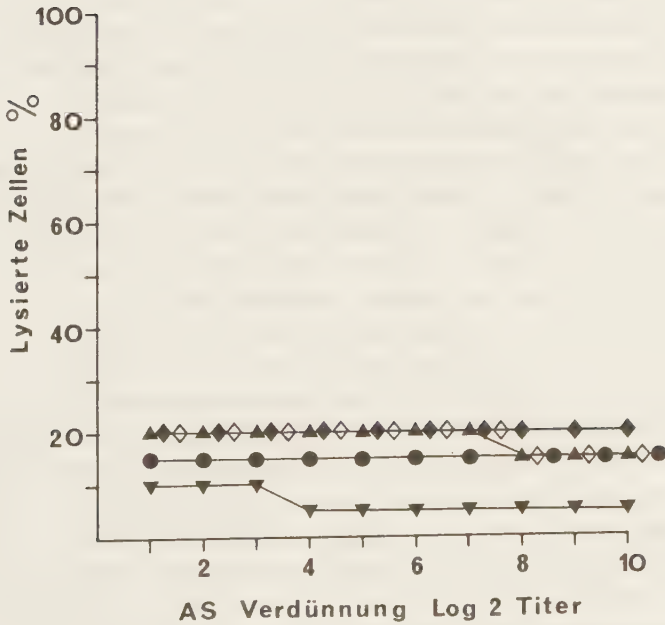


Abb. 10c: Zellen ohne Ia-Antigen-Ausprägung bei Patienten mit AML/AMML.

Patienten: ● R.S. (PBZ), ▲ K.G. (PBZ),
 ◆ C.K. (PBZ), ◇ (KM), ▼ J.K. (PBZ)

7. Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Klinische Zeichen der chronisch myeloischen Leukämie sind Spleno- und Hepatomegalie.

Charakteristisch für diese Erkrankung ist das Philadelphia Chromosom (Ph^1), das in 90 % der Fälle mit CML gefunden werden kann. Es handelt sich um eine Chromosomenaberration der Gruppe 21/22 nach Denver. Die 10 % der Patienten mit fehlendem Philadelphia Chromosom sollen eine schlechtere Prognose haben (6).

Als hämatologische Befunde sind Leukozytose, Anämie und ein oft erhöhter Hämatokrit-Wert zu nennen. Bei Betrachtung des Differentialblutbildes sind Zellen aller Reifungsstadien der Myelopoese zu sehen (6).

Dementsprechend lassen sich als immunologische Marker myeloische Antigene nachweisen.

Bei der Untersuchung der KM- und PBZ-Probe eines Patienten konnte keine Ia-Antigen-Ausprägung festgestellt werden (myeloische Antigene in der KBR: 1:32).

8. Blastenkrise (BC) bei chronisch myeloischer Leukämie

Nach einer länger dauernden Phase des chronischen Verlaufs einer myeloischen Leukämie, in der immer wieder durch Chemo- und/oder Strahlentherapie komplette oder Teil-Remissionen erzielt werden können, kommt es in ca. 80 % der Fälle zur Blastenkrise (6). Charakteristisch ist das Anschnellen der Leukozytenzahlen mit einer massiven Infiltration des Knochenmarks durch Myeloblasten. Der nun beginnende Krankheitsverlauf erinnert an das Krankheitsbild einer akuten Leukose. Der Myeloblastenschub ist in der Regel therapeutisch nicht mehr beherrschbar. (6). Bisweilen kann beobachtet

werden, daß lediglich der Blastenschub klinisch apparent wird, ohne daß zuvor Zeichen einer CML entdeckt waren. Diese als Primäre Blastenkrise einer CML bezeichnete Erkrankung beginnt also unter dem Bild einer Philadelphia Chromosom positiven Leukose (5). Bei den Zellen im Blastenschub kann es sich um Myeloblasten, myelo-monozytäre Blasten oder um Lymphoblasten handeln (6). Auch hier kommt der immunologischen Diagnostik Bedeutung zu, weil sie in der Lage ist, die durch morphologische Beurteilung und zytochemische Untersuchungen schwer einzuordnenden Blasten zu klassifizieren. So können hier eine myeloische, eine myeloisch-lymphatische und eine lymphatische Form unterschieden werden, wobei sich die lymphatische Form der BC durch das Vorhandensein von c-ALL-Antigen auszeichnet (48).

Bei der myeloischen Form der Blastenkrise wurden Proben (2 KM + PBL, 8 PBZ) von 10 Patienten untersucht. Die deutliche Ausprägung myeloischer Antigene im Zytotoxizitätstest, dem Komplementbindungstest oder dem Immunfluoreszenztest ermöglichte die oben genannte Zuordnung. c-ALL-Antigen konnte im Fluoreszenztest in keinem der Fälle nachgewiesen werden. Bei zwei Proben ließen sich bei der Untersuchung auf c-ALL-Antigen zytotoxische Indices von 65 % und 45 % im Zytotoxizitätstest feststellen. Der negative Immunfluoreszenztest und die starke Ausprägung myeloischer Antigene gaben den Ausschlag dafür, beide Fälle der myeloischen Form der Blastenkrise zuzuordnen. Eine einheitliche Reaktion der untersuchten Zellen mit Anti-Ia-Globulin konnte nicht festgestellt werden. Von 10 Patienten können 6 der Gruppe I (CI: 0 - 29 %) zugerechnet werden und 4 der Gruppe II (CI: 30 - 60 %). Große Schwankungen in der Markierung von Zellen aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark konnten nicht bemerkt werden.

Zwei Patienten (2 PBZ) wurden dem myeloisch-lymphatischen Typ der BC zugeordnet. Es konnten sowohl myeloische Antigene als auch c-ALL-Antigen nachgewiesen werden. Die Ia-Antigen-Ausprägung war stark positiv. Mit zytotoxischen Indices von 90 % und 65 % bei der Reaktion mit Anti-Ia-Globulin gehören beide der Gruppe III (CI: 60 - 100 %) an.

Eine lymphatische Form der BC wurde bei zwei Patienten (2 PBZ) diagnostiziert. Myeloische Antigene waren schwach positiv oder gar nicht nachzuweisen. Bei der Untersuchung auf c-ALL-Antigen im Zytotoxizitätstest konnte eine starke Antigen-Antikörper-Reaktion festgestellt werden. Die Reaktion mit Anti-Ia-Globulin war bei einem Patienten stark positiv (CI: 90 %, Log 2 Titer: 7), bei dem anderen (Patient: H.S.) negativ. Letzterer stand bis eine Woche vor Blutentnahme unter zytostatischer Therapie (H.S. graphisch nicht dargestellt).

Die Gruppe der Patienten mit Primärer Blastenkrise ist mit drei Fällen (2 KM, 1 KM + PBZ) vertreten. Bei allen war c-ALL-Antigen stark ausgeprägt. Bei einem Patienten fiel auch der Zytotoxizitätstest mit Anti-Granulozyten-Globulin stark positiv aus. Die Reaktion der Zellen mit Anti-Ia-Globulin war schwach bis mäßiggradig (CI: 5 % und 30 % (Gruppe I) und 40 % (Gruppe II)).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß sowohl bei der gemischt myeloisch-lymphatischen als auch bei der rein lymphatischen Form der BC bei CML eine starke Ausprägung von Ia-Antigen vorzufinden ist, während bei dem myeloischen Typ der BC und bei Primärer Blastenkrise kein oder ein nur sehr geringer Besatz der Zellen mit Ia-Antigen nachzuweisen war.

Verschiedene Formen der Blastenkrise (BC) bei chronisch myeloischer Leukämie (CML)

	Pat.	Myel. Ag.		c-ALL-Ag		Ia-Ag	
		PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM
		Cytotoxizitätstest		Cytotoxizitätstest		Cytotoxizitätstest	
		Log 2 Titer/CI (%)		Log 2 Titer/CI (%)		Log 2 Titer/CI (%)	
Myeloische Form	H.L.	8/65	—	5	—	5	—
	F.S.	1:32*/40	—	20	—	60	—
	Er.H.	1:32*/90 %*	—	20	20	10	30
	El.H.	7/95	—	45	—	35	—
	G.W.*	50 %*	—	—	—	10	—
	C.K.	1:32*/25 %*	—	20	—	10	—
	F.F.	20 %*	—	15	—	20	—
	M.S.	1:32*/40 %*	—	0	—	40	—
	K.D.	5/70	5/60	65	40	30	40
	E.R.	1:16*/45	40	20	10	0	—
Myeloisch-lymphatische Form	M.F.	20	—	30	—	7/90	—
	J.W.	35	—	20	—	6/65	—
Lymphatische Form	M.S.	40	—	9/90	—	7/90	—
	H.S.*	0	—	8/65	—	25	—
Primäre BC	J.C.	—	30	—	60	—	5
	M. K.	—	8/85	—	5/90	—	30
	L.D.	20	30	50	4/85	40	—

Tab. 8: Ausprägung von myeloischen Antigenen, c-ALL-Antigen und Ia-Antigen bei den verschiedenen Formen der Blastenkrise bei CML.

* graphisch nicht dargestellt — : nicht getestet

° Komplementbindungstest ° Immunfluoreszenztest

Abb. 11: Ausprägung von myeloischen Antigenen (myel. AG), c-ALL-Antigen (c-ALL-AG) und Ia-Antigen (Ia-AG) bei den verschiedenen Formen der Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie.

9. Megakaryozytäre Myelose

Bei der Megakaryozytenleukämie können zwei Verlaufsformen, eine akute und eine chronische unterschieden werden. Sie weisen in ihrem klinischen Bild Ähnlichkeiten mit akuten oder chronischen Myelosen auf.

Hämatologisch findet sich eine pathologische Proliferation innerhalb der Megakaryozytopoese (6).

Immunologische Untersuchungen ergaben in zwei Fällen einen positiven Nachweis myeloischer Antigenen. Oberflächenmarker, die auf Lymphozyten vorkommen, konnten nicht festgestellt werden. Die Untersuchung auf Ia-Antigen ergab in einem Fall, daß offenbar keine positive Reaktion stattgefunden hatte, im anderen ein mittlerer Ausprägungsgrad von Ia-Antigen nachweisbar war (CI: 45 %). Bei diesem Patienten fanden sich im Differentialblutbild ca. 80 % blastoide Zellen.

10. Sézary-Syndrom

Der Sézary-Syndrom ist eine Form der Leukämie, bei der eine Infiltration der hautnahen Bereiche erfolgt, was sich in klinischen Erscheinungen wie Erythrodermie und Juckreiz äußert.

Untersuchungen von Brouet u. a. (12,42) haben gezeigt, daß es sich bei den proliferierenden Zellen der kleinzelligen und auch der großzelligen Form des Sézary-Syndroms um Derivate der T-Zell-Reihe handelt.

Bei dem untersuchten Fall konnte die T-Zell-natur bestätigt werden. Der Nachweis von T-Antigen im Zytotoxizitätstest war stark positiv. Auf der Mehrzahl der Zellen befanden sich E-Rezeptoren. Andere Marker

wie Pre-T-Antigen, c-ALL-Antigen und Oberflächenimmunglobulin waren nicht nachzuweisen.

Bei Testung der Lymphozyten auf Ia-Antigen im Zytotoxizitätstest konnte keine spezifisch positive Antikörper-Reaktion festgestellt werden.

11. Prolymphozyten-Leukämie

Die besonderen klinischen und hämatologischen Kennzeichen der Prolymphozyten-Leukämie wurden erstmals von Galton (28,27) beschrieben. Klinische Befunde der Prolymphozyten-Leukämie sind Milztumor und hohe Leukozytenzahlen.

Bei Betrachtung der Zellmorphologie fällt die Zellgröße auf. Lymphozyten von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie erscheinen im Vergleich kleiner, außerdem fehlt ihnen der Nucleolus, der für Prolymphozyten charakteristisch ist. Als zytochemischer Befund fällt häufig eine hohe Aktivität der Alkalischen Leukozyten-Phosphatase auf.

Auch bei dieser Leukämie kann eine Gruppe mit Lymphozyten B-zellulärer Herkunft und eine andere mit T-Zell-Ursprung unterschieden werden (43).

Der untersuchte Fall mit Prolymphozyten-Leukämie war negativ für E-Rosetten, T-Antigen und Pre-T-Antigen. Auch c-ALL-Antigen konnte nicht nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von Oberflächenimmunglobulin zusammen mit der Zellmorphologie führten zur Diagnose eines B-Zell-Typs. Bei der Untersuchung auf das Vorkommen von Ia-Antigen fand sich eine positive Reaktion (CI: 75 %, Log 2 Titer: 6).

12. Haarzell-Leukämie

Als klinische Zeichen der Haarzell-Leukämie finden sich Pancytopenie und Splenomegalie. Diese Leukämieform zeichnet sich durch einen chronischen und relativ benignen Verlauf aus. Ihren Namen bekam sie aufgrund der speziellen Zellmorphologie. Charakteristischerweise sind haarfeine Zytoplasmaausläufer zu sehen. Lange Zeit war ihre zelluläre Herkunft umstritten. Neueste Befunde sprechen dafür, daß es sich um Lymphozyten und nicht um Monozyten handelt, wie zeitweise angenommen wurde (22,73,49). Ein weiteres Kennzeichen der Haarzell-Leukämie ist das Tartrat resistente Isoenzym V der sauren Phosphatase (73).

Bei zwei Patienten mit Haarzell-Leukämie, deren PBZ auf Ia-Antigen hin untersucht wurden, fand sich bei der einen Probe eine stark positive Reaktion, bei der anderen keine. Der letzte Patient befand sich klinisch in Remission, so daß keine Leukämiezellen zu erwarten waren und von einem normalen Zellbild ausgegangen werden mußte. Alle übrigen immunologischen Markeruntersuchungen waren bis auf Oberflächenimmunoglobuline negativ.

S é z a r y - S y n d r o m

E-Rosetten (bei 37°C/%)	T-Antigen		Pre-T-Antigen		c-ALL-Antigen		SmIg(Polyv.)		Ia-Antigen	
	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM	PBZ	KM
Pat. PBZ	KM	Cytotoxizitätstest Log 2 Titer/CI (%)	Cytotoxizitätstest Log 2 Titer/CI (%)	Cytotoxizitätstest Log 2 Titer/CI (%)	Cytotoxizitätstest Log 2 Titer/CI (%)	Cytotoxizitätstest Log 2 Titer/CI (%)	(%)		Cytotoxizitätstest Log 2 Titer/CI	
J.K. 10	-	6/85	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	10

Prolymphozyten Leukämie

K.H. 0	-	-	-	-	-	-	22	-	6/75
--------	---	---	---	---	---	---	----	---	------

Haarzell-Leukämie

H.G. 0	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	26	-	20
A.M. 0	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	29	-	7/90

CML

T.S. 0	0	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	-	-	15
--------	---	------	------	------	------	------	------	---	---	----

→ Myel. Ag.: 1:32 (KBR-Wert)

Megakaryozytäre Myelose

S.G. 0	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	15
A.B. 0	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	45

→ Myel. Ag.: 6/90 (Cytotoxizitätstest)

→ " " : 55 % (IF-Wert)

KM-infiltrierender Tu.

K.B. -	0	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-	neg.	-
--------	---	---	------	---	------	---	------	---	------	---

Tab. 9: Ausprägung von Ia-Antigen im Cytotoxizitätstest bei Sézary-Syndrom, Prolymphozyten-Leukämie, Haarzell-Leukämie, chronisch myeloischer Leukämie, megakaryozytärer Myelose und einem das Knochenmark infiltrierenden Tumor. Andere immunologische Oberflächenmarker sind zur Ergänzung mitaufgeführt.

13. Bakterienbindungstest

Mit dem Rosettentest wird eine Untersuchungsmethode vorgestellt, bei der eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit Hilfe eines Bakterienindikatorsystems sichtbar gemacht wird. Wenn ein Antiglobulin mit dem Antigen auf der Zelloberfläche reagiert hat, können sich Bakterien des Staphylokokkus Stammes Cowan I (siehe 1.4.) mit dem Antikörper verbinden. Dieser spezielle Bakterienstamm zeichnet sich durch die Synthese von Protein A aus, das eine hohe Affinität zum Fc-Teil des Antikörpers besitzt, wodurch die Verbindung von Antikörper und Bakterien ermöglicht wird. Das abschließende Anfärben von Zellen und Bakterien erlaubt eine Beurteilung der Zellmorphologie und gleichzeitig die Aussage, ob eine Reaktion zwischen Antigen und Antikörper stattgefunden hat.

Wichtige Kriterien bei der Entwicklung eines neuen Testsystems sind Spezifität, Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Spezifität der Methode ist durch die oben genannte Reaktionsweise von Antigen-Antikörper und Bakterien gegeben. Um die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit zu prüfen, wurde bei allen Untersuchungen die Korrelation zum Zytotoxizitätstest analysiert.

Um eine unspezifische Anlagerung von Immunglobulin auszuschließen, wurde eine Kontrolle mit Kaninchen-Normal-Immunglobulin mitgeführt. Wenn diese negativ ausfällt, kann eine Bakterienrosettenbildung nur durch eine spezifische, immunologische Markierung bewirkt werden.

Da einige Subtypen von Lymphozyten in der Lage sind, Bakterien spontan zu binden (60,93,67), wurde eine weitere Kontrolle mit untersucht, bei der nur Bakterien und Zellen inkubiert wurden.

Die einzelnen Werte für 22 untersuchte Proben werden in Tabelle 10 aufgeführt.

In Tabelle 11 werden der zytotoxische Index und die Zahl der Zellen mit Bakterienrosetten verglichen. Der korrigierte Wert für die Rosetten wurde gewonnen, indem von dem Ansatz mit Anti-Ia-Globulin der höchste Rosettenwert aus den zugehörigen Kontrollen subtrahiert wurde. Die Markierungsdifferenz zwischen dem zytotoxischen Index und dem Wert für die Bakterienrosetten wird für jede untersuchte Probe angegeben. Sie beträgt bei 17 von 22 Fällen (77,3 %) 0-20 %. Bei zwei Proben (9,1 %) fand sich ein Unterschied von 22 % und 27 %, bei einer weiteren eine Differenz von 52 %. In diesem Fall betrug die Differenz zwischen zytotoxischem Index und Bakterienrosetten bei der Inkubation mit Anti-Ia-Globulin 38 %. Hier kam es offensichtlich zu einer durch die unterschiedlichen Testsysteme bedingten verschieden starken Markierung der leukämischen Zellen. Die Kontrollwerte von 14 % für Bakterienrosetten nach Inkubation mit Kaninchen-Normal-Immunglobulin und ebenfalls 14 % nach Bakterienzusatz ohne Antikörperzugabe fallen nicht aus der Gruppe der Kontrollwerte für die übrigen Proben heraus.

Die Grenzen der Methode treten bei der Betrachtung der beiden Differenzwerte von 66 % und 70 % zu Tage. Beide kommen durch die hohe Anzahl von Zellen zustande, die in der Lage waren, sich ohne Antiserum spontan mit Bakterien zu umlagern. Auf dieses Phänomen wurde bereits hingewiesen. In diesen beiden Fällen kann also keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Rosettenbildung durch die Reaktion von Antigen und Antikörper mit anschließender Bakterienanlagerung oder durch Spontanbindung von Bakterien an Lymphozyten bewirkt worden

Bakterienbindungs-TestKontrollen

Diagnose	Pat.	Cytotoxizitäts- test (Log 2 Titer/CI(%))	Ansatz mit Ia-Anti- körpern		Ansatz mit Kaninchen- Normal-Immunglobulin		Ansatz nur mit Bakterien	
			Rosetten (%)	Phagozytose (%)	Rosetten (%)	Phagozytose (%)	Rosetten (%)	Phagozytose (%)
c-ALL	E.S.	7/95	77	2	2	1	2	2
	R.S.	8/65	64	6	7	5	7	4
	K.G.	60	70	1	5	2	10	1
	B.G.	45	45	2	2	1	6	4
	C.L.	8/75	70	1	0	0	61	0
	P.C.	10	15	4	5	5	5	4
	A.S.	30	30	5	7	7	14	7
c/T-ALL	M.S.	0	30	0	13	0	11	1
T-ALL	S.H.	0	2	5	1	5	0	8
AUL	M.F.	7/90	85	5	7	2	12	1
	G.S.	0	25	18	15	25	20	27
	D.O.	7/100	62	25	14	22	14	27
CLL	G.B.	7/100	73	7	0	0	1	0
	P.R.	7/85	85	4	4	0	2	0
	F.S.	6/80	87	3	0	0	3	0
	H.H.	7/70	90	1	3	6	5	1
Prolympho- zyten-Leu- kämie	K.H.	6/75	90	3	91	4	85	7
AML	R.S.	0	7	1	10	0	9	1
BC bei CML	E.R.	0	0	1	0	1	0	3
	M.S.	40	25	3	3	5	2	2
	G.W.	0	35	4	13	4	3	4
Megakaryo- zytäre Myelose	S.G.	15	22	34	15	34	16	30

Tab. 10: Quantitative Bakterienrosettenbildung und Phagozytoserate nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin, Kaninchen-Normal-Globulin und alleiniger Zugabe von Bakterien. Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests wurden ergänzend mitaufgeführt.

<u>Patient</u>	<u>Diagnose</u>	<u>CI (%)</u>	<u>Rosetten (%)</u>	<u>Differenz</u>
E.S.	c-ALL	95	75	20
R.S.	c-ALL	65	57	8
K.G.	c-ALL	60	60	0
B.G.	c-ALL	45	39	6
C.L.	c-ALL	75	9	66
P.D.	c-ALL	10	10	0
A.S.	c-ALL	30	16	14
M.S.	c/T-ALL	0	17	17
S.H.	T-ALL	0	1	1
M.F.	AUL	90	73	17
G.S.	AUL	0	5	5
D.O.	AUL	100	48	52
G.B.	CLL	100	73	27
?R.	CLL	85	81	4
F.S.	CLL	80	84	4
H.H.	CLL	70	85	15
K.H.	Prolymphozyten- Leukämie	75	5	70
R.S.	AML	0	-3	3
E.R.	BC bei CML	0	0	0
M.S.	BC bei CML	40	22	18
G.W.	BC bei CML	0	22	22
S.G.	Megakaryozytäre Myelose	15	7	8

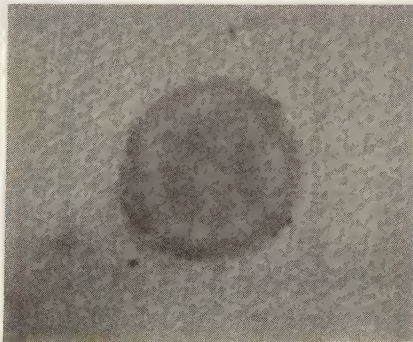
Tab. 11: Vergleich zwischen zytotoxischem Index und Bakterienrosetten. Die Zahl der Bakterienrosetten nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin wurde wie folgt korrigiert: von dem Wert für Bakterienrosetten nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin wurde die höchste Bakterienrosettenzahl aus den zugehörigen Kontrollen subtrahiert.

ist. Diese Spontanbindung wurde bei einer Prolymphozytenleukämie und einer c-ALL beobachtet. Abgesehen von den genannten zwei Fällen kann jedoch eine gute Übereinstimmung zwischen der Zahl der im Zytotoxizitätstest lyseierten Zellen und der Zellzahl mit Bakterienrosetten festgestellt werden.

Mit dem Zytotoxizitätstest kann bestimmt werden, bei welchen Leukämieformen Ia-Antigen ausgeprägt ist und in welchem quantitativen Umfang. Der Bakterienrosettentest bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Aussagen über die Zellmorphologie zu machen. Im Folgenden wird aufgezeigt werden, welche Zellen innerhalb der Granulopoese Ia-Antigen-Besatz aufweisen, und es werden exemplarisch einige Leukämieformen nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin und Bakterien vorgestellt:

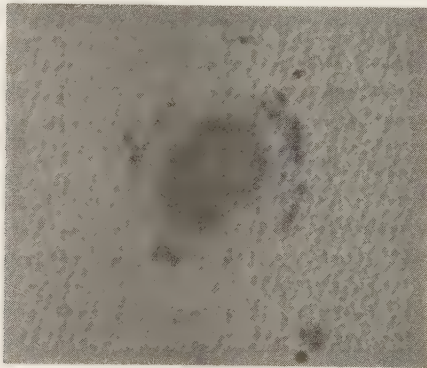
Abb. 12 zeigt eine Zelle mit einem großen, runden, leicht eingebuchteten Kern mit einer feinnetzigen Chromatinstruktur, in der Kernkörperchen zu erkennen sind. Das Zytoplasma liegt als schmaler, homogener Saum um den Kern. Durch die Panoptische Färbung nach Pappenheim wurde es dunkelblau angefärbt. An diese Zelle haben sich Bakterien angelagert. Sie wurde als Myeloblast klassifiziert.

Abb. 12:



Dem Myeloblasten folgen innerhalb der Zellreifung Promyelozyten (ohne Abbildung). Im weiteren Verlauf der Granulopoese konnte ein Myelozyt nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin mit Bakterien markiert werden (Abb. 13). Die Kernstruktur hat sich gegenüber dem Myeloblasten vergrößert und Nukleoli sind nicht mehr zu erkennen. Die Zytoplasmamenge hat sich vergrößert. Das Zytoplasma färbt sich hellgrau. Bei dieser Zelle findet man neutrophile Granula im Zytoplasma. Bakterien werden nach Anti-Ia-Globulin-Zugabe gebunden.

Abb. 13:



Der dem Myelozyten folgende Metamyelozyt weist einen deutlich eingebuchteten Kern auf, dessen Chromatin sich weiter vergrößert hat und nunmehr eine schollige Struktur aufweist. Das Zytoplasma behält seine zart blau-graue Farbe mit neutrophiler Granulation. Auch diese Zelle lagerte spezifisch Bakterien an und wies

sich somit ebenfalls als Ia-Antigen positiv aus Abb. 14).

Weitere Verdichtungen des Chromatins und ein bandartig gebogener Kern kennzeichnen den stabkernigen neutrophilen Granulozyten. Abschnürungen von Kernbestandteilen führen zum segmentkernigen Granulozyten. Das Zytoplasma dieser Zellen färbt sich blaß-blau-rötlich. Es enthält weiterhin die typischen neutrophilen Granula. Bei beiden Zellen konnte keine spezifische Bakterienbindung nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin festgestellt werden (Abb. 15).

Abb. 14:

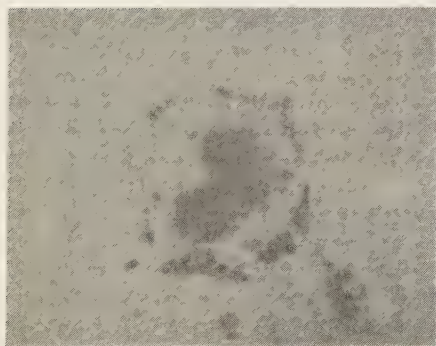


Abb. 15:



Auch Monozyten wurden auf ihr Verhalten nach Zugabe von Anti-Ia-Globulin und Bakterien überprüft. In Abb. 16. wurde eine Zelle mit Bakterienrosettenbildung nach Inkubation mit Anti-Ia-Globulin photographiert, die aufgrund ihrer Zellgröße, des gelappten Kerns mit seiner lockeren Chromatinstruktur und der grau-blauen Färbung

des Zytoplasmas als Monozyt klassifiziert wurde. Eine spezifische Rosettenbildung bei Monozyten wurde äußerst selten beobachtet, während Bakterien phagozytierende Monozyten regelmäßig in allen durchgemusterten Präparaten vorgefunden wurden. In Abb. 17 ist ein Bakterien phagozytierender Monozyt inmitten zweier Ia^- -Lymphozyten dargestellt. Dieses Phänomen konnte nur bei Monozyten nachgewiesen werden. Die Phagozytoserate lag bei allen Proben zwischen 0 % und 20 %. Lediglich bei einem Fall mit megakaryozytärer Myelose und bei zwei Patienten mit AUL wurden bis 34 % (megakaryozytäre Myelose) und 27 % (AUL) phagozytierende Zellen ausgezählt. Eine relativ konstante Phagozytoserate bei der Untersuchung mit Anti- Ia -Globulin und den beiden zugehörigen Kontrollproben wurde von mir als Indiz angesehen, daß in dem jeweiligen Präparaten repräsentative Stellen mikroskopisch ausgewertet worden waren.

Abb. 16:

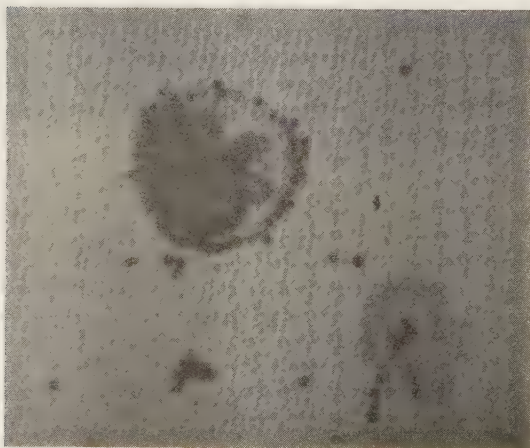
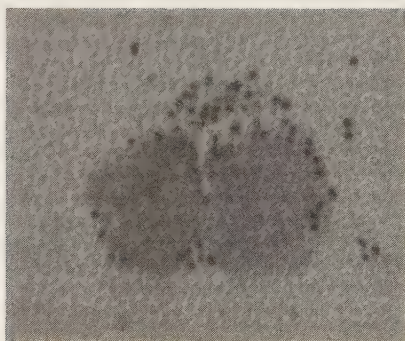
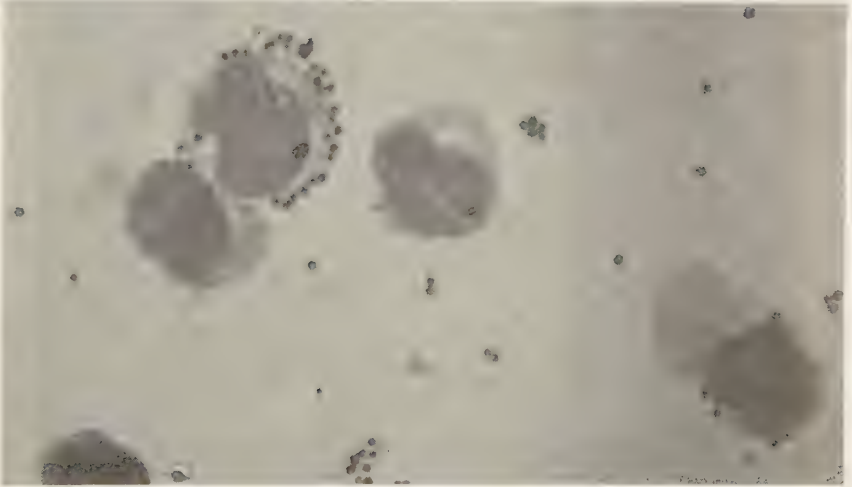


Abb. 17:

Differenzierungsstufen der Lymphopoese wurden in Form verschiedener ALL-Typen untersucht. Dabei wurde die Korrelation zwischen den hierbei vorkommenden unreifen und reifen lymphozytären Zellen, Ia-Antigen-Besatz und Bakterienbindung geprüft. Abb. 18 zeigt zwei Lymphoblasten einer c-ALL. Diese Zellen besitzen ein relativ grobes Chromatingerüst mit einem deutlich sichtbaren, mittelgroßen Nukeolus. Der Kern ist von einem schmalen, zart blauen Zytoplasmasaum umgeben. An beiden Zellen wurden nach Anti-Ia-Globulin-Zugabe Bakterien angelagert.

Abb. 18:

In Abb. 19. sind große und kleine Lymphozyten aus dem peripheren Blut photographiert. Sie entstammen der aleukämischen Form einer c-ALL. Beide Lymphozytenformen konnten mit Bakterien markiert werden. Der größere Lymphozyt unterscheidet sich von dem kleinen durch seinen größeren eingebuchteten Kern mit aufgelockertem Chromatin und durch seinen helleren, breiteren Zytoplasmasaum. Daruch, daß es sich bei dieser Leukämie um eine aleukämische Verlaufsform handelt, entsprechen die abgebildeten Zellen normalen Lymphozyten aus dem peripheren Blut.

Abb. 19:

Lymphozyten, die sich kaum von reifen Zellen des normalen peripheren Blutes unterscheiden finden sich auch bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL). Typischerweise können bei dieser Leukämieform zerstörte Zellen beobachtet werden, die als Gumprecht'sche Kernschatten imponieren. Die abgebildeten Lymphozyten binden Bakterien nach der Inkubation mit Anti-Ia-Globulin. Ia-Antigen kann also auf der Zelloberfläche der meisten dieser Zellen nachgewiesen werden (Abb. 20).

Abb. 20:

Leukämisch veränderte lymphatische Zellen wurden bei einer T-ALL vom "convoluted cell type" gefunden. Auffallend hierbei ist die Lappung des Zellkerns mit groben Chromatinschollen. Das Zytoplasma, das den Kern mit einem schmalen Saum umgibt, färbte sich hellgrau-blau an. Diese Zellen lagerten keine Bakterien an. Ia-Antigen-Besatz kann somit ausgeschlossen werden (Abb. 21).

Abb. 21:



IV. D I S K U S S I O N

1. Zur Bedeutung des Ia-Antigens als Differenzierungsantigen auf Zelloberflächen

Nachdem im Mäusesystem ein der I-Region des HLA-D-Locus zugehöriges Antigen entdeckt worden war (nachfolgend als Ia-Antigen bezeichnet) (20), wurde nach Herstellung von spezifischen Antiseren (9) versucht, das Vorkommen und die Funktion im menschlichen Organismus aufzudecken. Reaktionen mit Anti-Ia-Globulinen wurde bei der Untersuchung von Blutzellen mit 95 % der normalen B-Lymphozyten und einer T-Zell-Subpopulation festgestellt (86).

Ia-Antigen scheint notwendig zu sein für die T-zell-abhängige Immunantwort von B-Zellen und zur Kooperation von T-Zellen und Makrophagen (39). Eine Beteiligung des Antigens bei der Antigenbindung durch Immunglobulin-Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden (39).

Ausprägung von Ia-Antigen war auf Suppressor-T-Zellen festzustellen, während auf Helfer-Zellen kein Antigen gefunden wurde. Jedoch scheint die Induktion von Helfer-Zellen in vitro von Ia positiven hinzukommenden Zellen abhängig zu sein. Die Funktion des Antigens auf Suppressor-Zellen ist zur Zeit unklar. Eine Vermehrung der Ia-Antigenmenge auf Suppressor-Zellen erfolgt möglicherweise nach Antigenstimulation (39,40,91). Stimulierung durch Concanavallin A (Con A) oder Phythaemagglutinin (PHA) bewirkt ein Anwachsen speziell der T (8)-Fraktion (T-Zellen mit Rezeptoren für Ig G), wobei die Fc-Rezeptoren-Aktivierung die Ia-Antigen-Ausprägung nicht beeinflusst haben soll. Auch wird die

T-(ϕ) Gruppe selbst als heterogen für Ia-Antigen angesehen, da nur auf 38 % der T(ϕ)-Zellen, die 1 - 5 % der T-Zellen ausmachen, Ia-Antigen nachweisbar war (52,36).

Ia-Antigen fehlt auf Erythrozyten und Thrombozyten (86).

Ferner wurde nachgewiesen, daß das Ia-Molekül nicht identisch ist mit SmIg und β_2 -Mikroglobulin, einem Bestandteil von HLA-A- und HLA-B-Molekülen in der Zellmembran (100,86,1). Es wurde außerdem die Unabhängigkeit einer molekularen Existenz von Fc-Rezeptoren einerseits und Ia-Antigen andererseits aufgezeigt (100).

Die Untersuchung von Ia-Antigen und Komplementrezeptoren auf myeloischen Zellen ergab, daß Ia-Antigen nur auf Myeloblasten und sehr unreifen Promyelozyten vorkommt und C3d als erster Komplementrezeptor auf Myelozyten erst dann erscheint, wenn bereits kein Ia-Antigen mehr nachweisbar war (84,101). Nach anderen Untersuchungen sollen Promyelozyten insgesamt negativ sein (35,47). Nach Mitteilung anderer Autoren ist Ia-Antigen sogar noch auf Metamyelozyten zu finden (101).

Ähnlich diskrepante Befunde liegen für die Ia-Antigen-Ausprägung auf Monozyten vor. Nach einigen Untersuchungen sollten die meisten Monozyten Ia^- sein, doch soll es wenige geben, die Ia^+ sind (101,47). Auch wird über unterschiedliche Antigendichten auf Monozyten berichtet, wobei die Dichte von Ia-Antigen (HLA-D) geringer sein soll als die Dichte von HLA-A- und HLA-B-Antigen. Diskutiert wird demzufolge die Existenz von verschiedenen HLA-D $^+$ und HLA-A $^+$, HLA-B $^+$ -Subpopulationen von Monozyten (61).

Granulozyten-Monozyten-Vorläufer-Zellen sowie megakaryozytäre Stammzellen werden als Ia^+ angesehen (54). Manche Autoren gehen davon aus, daß Ia-Antigen auf Vorläuferzellen aller hämopoetischen Linien vorkommt (61), während die pluripotente Stammzelle kein Ia-

Antigen aufweisen soll (35,4,66), aber auch hier werden gegenteilige Ansichten vertreten (47,103).

Ia-Antigen soll eine bisher noch nicht bekannte Funktion bei der frühen hämopoetischen Differenzierung zukommen (47,31).

2. Besprechung der eigenen Versuchsergebnisse

Im vorangegangenen Kapitel wurde ein Überblick über bisherige Untersuchungsergebnisse der Ausprägung von Ia-Antigen auf Blut- und Knochenmarkzellen gegeben. In den folgenden Ausführungen sollen meine Ergebnisse über das Vorkommen von Ia-Antigen auf Leukämiezellen mit den Befunden anderer Autoren verglichen und diskutiert werden.

Zunächst wurde die Gruppe der c-ALL als einheitlich angesehen. Das Markermuster ergab folgendes Bild: c-ALL⁺, E-Rosetten⁻, HUTLA⁻, SmIg⁻, HUBLA⁺ (entspricht Ia⁺), TdT⁺ und Hex I⁺ (85,18,95,34). Inzwischen aber gibt es Anhaltspunkte, daß es sich bei der c-ALL um eine in sich heterogene Gruppe von Leukämien handelt (68). Die Mehrzahl der Zellen soll Ia⁺, Fcγ-Rezeptor⁺ sein, einige sollen zusätzlich einen Rezeptor für C3 aufweisen. Unterschiedlich soll u. a. auch der Rezeptorenbesatz für SmIg sein. Bei einigen Null-Zellen war zytoplasmatisches Ig festzustellen. Ein geringer Teil bildete Rosetten mit Schaeferythrozyten, ein anderer mit Mäuseerythrozyten nach Vorbehandlung mit Neuraminidase (68). Auch konnte eine schwache Reaktion mit antimyelozytären Antikörpern beobachtet werden (68).

Die eigenen Ergebnisse stimmen mit denen von Niaudet (68) insoweit überein, als daß auch in der vorliegenden Arbeit sowohl das Vorhandensein als auch das Nicht-

Vorhandensein von Ia-Antigen auf c-ALL positiven Zellen festgestellt werden konnte. Wie in Abb. 7 a - d dargestellt, ergab sich die Ausprägung von vier Gruppen innerhalb der c-ALL. Interessanterweise konnte bei fünf Fällen neben der Markierung durch c-ALL und Ia-Antiglobulin eine deutliche Ausprägung von Pre-T-Antigen festgestellt werden. Es könnte sich dabei um eine bisher noch nicht beschriebene Leukämieklasse handeln, die aus einer sehr frühen Entwicklungsstufe in Richtung auf T-Zellreifung hervorgeht. Ia-Antigen tritt während der Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle zur reifen T- oder B-Zelle offenbar als ein sehr früher Oberflächenmarker auf, der sich noch auf der Zelloberfläche hält, wenn bereits die ersten Differenzierungsschritte in Richtung auf T- oder B-Zellen vollzogen worden sind. So sind Pre-B-Zellen, deren besonderes Kennzeichen zytoplasmatisches Ig M ist, ebenfalls als Ia⁺ beschrieben worden (37,13). Bei einer aleukämischen Verlaufsform der c-ALL, bei der c-ALL-Antigen lediglich auf Zellen des Knochenmarks festgestellt werden konnte, fehlte bei meinen Untersuchungen ebenso die Ia-Antigen-Ausprägung auf den Lymphozyten in der Peripherie. Da nur ein Wert für eine KM-Probe vorliegt, kann über das Verhalten von Ia-Antigen bei der aleukämischen Verlaufsform der c-ALL im KM keine generelle Aussage gemacht werden. Warum bei diesem Patienten (Ha.G.), bei dem KM vor und vier Tage nach Beginn einer zytostatischen Therapie untersucht wurde, ein leichtes Ansteigen von Ia⁺-Zellen während der Therapie bei gleichzeitigem Absinken der c-ALL⁺-Zellen verzeichnet werden kann, ist unklar. Weiterhin fallen vier Fälle mit c-ALL auf, bei denen auf Zellen im peripheren Blut sowohl c-ALL-Antigen als auch Ia-Antigen nur schwach bis mäßiggradig nachgewiesen werden konnte, während das Knochenmark

für beide Marker deutlich positiver war. Möglicherweise unterliegen die verschiedenen Zellen der einzelnen Leukämieformen auch unterschiedlichen Mechanismen der Ausschleusung aus dem Knochenmark in die Peripherie. Klinische Beobachtungen werden zeigen müssen, ob sich prognostische Unterschiede für den Verlauf der Erkrankung aus dem diskrepanten Verhalten von peripheren Blutzellen und Knochenmarkzellen herleiten lassen.

Die Patienten mit c-ALL-Rezidiven zeigten eine deutliche Ausprägung von Ia-Antigen auf Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks. Ein neues Markermuster kann nicht beobachtet werden. Alle Fälle lassen sich in die bereits für c-ALL gebildeten Gruppen einreihen. Auffallend ist die starke Markierung der Zellen des Knochenmarks sowie des peripheren Blutes mit Anti-Ia-Globulin (KM, CI: 100 %; PBZ, CI: 90 %) bei dem Patienten R.K., bei dem c-ALL-Antigen hingegen deutlich schwächer ausgeprägt war (KM, CI: 40 %; PBZ, CI: 55 %). Es könnte sich dabei um eine neue Subklasse einer Leukämieform handeln, die sich innerhalb der c-ALL aufgrund des besonderen quantitativen Verhältnisses von c-ALL-Antigen zu Ia-Antigen-Ausprägung herausbildet.

Es konnte gezeigt werden, daß Ia-Antigen kein reiner B-Zell-Marker ist, sondern daß sich dieses Antigen auch auf Subpopulationen von T-Zellen, den Suppressor-Zellen, nachweisen läßt (52,39,40,36). Bei vier untersuchten Fällen von c/T-ALL und acht mit T-ALL war allerdings ein spezifischer Nachweis von Ia-Antigen auf T-Zellen weder bei der Untersuchung von Knochenmark noch von peripheren Blutzellen möglich. Untersuchungen von Winn (104) haben gezeigt, daß eine komplementabhängige Zytotoxizitätsreaktion u. a. von der Dichte der nachzuweisenden Antigene auf der Zelloberfläche

abhängig ist. Bei den vorliegenden Ergebnissen kann daher nicht mit letzter Sicherheit beurteilt werden, ob eine zu geringe Antigendichte den Nachweis von Ia^+ T-ALL nicht ermöglichte, oder ob tatsächlich keine Ausprägung von Ia-Antigen auf T-Lymphoblasten vorlag.

Bei den akuten undifferenzierten Leukämien (AUL), die das Markermuster T^- , $Pre-T^-$, $c-ALL^-$ und $SmIg^-$ zeigten, ließen sich für die Ausprägung von Ia-Antigen drei Gruppen klassifizieren. Lediglich bei neun von 22 Patienten war keinerlei Ia-Antigen nachzuweisen, d. h. daß der Anteil der Leukämien ohne jeden Marker nur noch 40,9 % betrug. Von den restlichen 59,1 % waren 36,4 % stark positiv für Ia-Antigen. Bei den übrigen 22,7 % waren zwischen 40 % und 55 % der Zellen markiert. Es zeigt sich hierbei wiederum, daß Ia-Antigen durchaus nicht nur in Verbindung mit c-ALL-Antigen oder nur auf B-Zellen vorkommt, wie auch schon bei Greaves beschrieben (31). Die bisherigen Untersuchungen lassen es möglich erscheinen, daß die hier als Ia^+ AUL eingestufteten Zellen sich von sehr frühen Differenzierungsstufen, die im Bereich der PSC lokalisiert sind, herleiten. Die Ia^- AUL entsprechen vielleicht auch dieser frühesten Reifungsstufe, verlieren jedoch ihre Fähigkeit zur Ia-Antigen-Ausprägung sehr bald, möglicherweise, wie von Basch (4) und Moore (66) vermutet, während des Durchlaufens eines Zellteilungszyklus. Diese dann Ia^- -Zelle könnte die "target"-Zelle für den weiteren pathologischen Proliferationsprozeß werden, der die Ia^- -AUL einleitet.

Mit Blick auf die therapeutischen Konsequenzen soll noch einmal auf den Fallbericht von Goldstone verwiesen werden (29). Hier wird ein Zusammenhang hergestellt zwischen dem immunologischen Markermuster und dem Ansprechen auf Chemotherapie. Bei einer Patientin mit einer akuten Leukämie mit folgender Markerausprä-

gung: ALL⁺, Ia⁻, TdT⁺, HUTLA⁻, My⁻ kam es im Verlauf der Erkrankung zum Überhandnehmen eines Subclons mit folgendem Markermuster: ALL⁻, Ia⁺, TdT⁺, HUTLA⁻, My⁻. Das Vorherrschen von Ia⁺-AUL-Zellen war mit einer zunehmenden Resistenz gegen Chemotherapeutika vergesellschaftet. Es konnte das Auftreten einer neuen Leukämie unabhängig von der ersten ausgeschlossen werden.

Bei den 14 vorliegenden Fällen mit CLL hat die immunologische Markerdiagnostik ergeben, daß es sich um B-CLL-Formen handelt. Die Präsenz von Ia-Antigen auf B-Zellen ist inzwischen von vielen Autoren beschrieben worden (33,100,39,87,40,86,31...). Somit erscheint es nicht überraschend, daß in 12 Fällen die Ausprägung von Ia-Antigen in hohem Maße vorhanden ist. Der geringe Prozentsatz markierter Zellen bei dem Patienten H.H. erscheint dadurch erklärbar, daß auf ca. 40 % der Zellen T-Antigen nachzuweisen war, und daß die Markierungsrate sich durch das Vorhandensein von einer T-/B-Zellmischpopulation verringerte. Bei dem Patienten K.S. wurden im Blutaussstrich relativ viele Prolymphozyten festgestellt. Das Ergebnis der Testung mit Anti-Ia-Globulin stimmt gut mit dem Wert überein, der bei der Untersuchung einer Prolymphozyten-Leukämie gefunden wurde. Auch in diesem Fall kann das Vorliegen einer heterogenen Zellpopulation die etwas verminderte Zahl Ia-Antigen-positiver Zellen erklären.

Die Gruppe der akuten myelo-monozytären Leukämien erwies sich heterogener als erwartet bezüglich ihrer Ia-Antigen-Ausprägung. Überraschenderweise konnte bei vier von neuen Patienten keinerlei Ia-Antigen nachgewiesen werden. Bisher wurden AML-Blasten überwiegend als positiv für Ia-Antigen angesehen (33,87,31), wobei die Antigendichte auf der Zelle allerdings geringer sein soll als auf Blasten bei ALL. Allerdings wurden auch

Ia⁻-AML-Blasten beschrieben (101,35,47,103). Nachdem den vorliegenden Untersuchungen der Zytotoxizitätstest zugrunde liegt, war keine Aussage über die Morphologie der Zellen möglich. Wie in IV. 1. ausgeführt wurde, liegen diskrepante Untersuchungsergebnisse über das Vorhandensein von Ia-Antigen auf myeloischen Zellen während ihrer Entwicklung von der Stammzelle bis zum segmentkernigen Leukozyten vor. Aber auch bei myeloischen Zellen scheint Ia-Antigen ein Marker früher Entwicklungsstufen zu sein, fraglich erscheint nur, bei welcher Zellart der definitive Verlust von Ia-Antigen als gesichert angesehen werden kann (siehe IV. 1.). Bei Fällen mit starker Ia-Antigen-Ausprägung erscheint somit wahrscheinlich, daß zum größten Teil Myeloblasten vorgelegen haben. Bei den Ia⁻-AML/AMML könnte ein Differenzierungsstillstand erst später nach Erscheinen Ia⁻-Blasten oder reiferer myeloischer Zellen vorgelegen haben, so z. B. bei Myelozyten oder sich im Anschluß daran entwickelnden Zellen, die Ia⁻ sein sollen (33,84,31). Schwierig erscheint die Interpretation der Gruppe II mit zytotoxischen Indices zwischen 30 und 60 %, was auch noch als spezifische Markierung angesehen werden muß. Es kann nicht geklärt werden, ob es sich dabei um heterogene Zellpopulationen gehandelt hat, in der sich nur eine geringe Menge von Ia⁺-Blasten befand, oder ob eine Leukämie mit mehr monozytären Elementen oder reiferen myeloischen Zellen vorlag. Auch könnte bei diesen Fällen eine geringere Antigendichte bei einem Teil der Zellen eine höhere Markierungsrate mit Anti-Ia-Globulin verhindert haben.

Über die Ausprägung von Ia-Antigen bei chronisch myeloischer Leukämie liegen unterschiedliche Aussagen vor. Zunächst wurden die CML als negativ für dieses Antigen angesehen (87). Schließlich fanden sich doch einige

Fälle mit Ia^{+} -Myeloblasten und sogar einige Ia^{+} -Promyelozyten, wobei im Verhältnis bei der CML mehr Ia^{-} -Myeloblasten vorkommen sollen als bei der akuten myeloischen Leukämie (103). Insgesamt wird der Anteil der Ia^{+} -Blasten auf 20 % bis 30 % aller Myeloblasten bei CML geschätzt (101).

Etwas anders scheint die Situation nach Beginn der Blastenkrise (BC) zu sein. Ia -Antigen läßt sich auf undifferenzierten Blasten einer Philadelphia-Chromosom-positiven lymphatischen Form der Blastenkrise nachweisen (48,47). Allerdings wurde auch ein Fall mit folgendem Oberflächenmarkermuster beschrieben: $c-ALL^{-}$, Ia^{-} , $HUTLA^{-}$, E^{-} , $SmIg^{-}$ (47). Bei der myeloischen Form der BC konnten sowohl einige mäßig positive Myeloblasten nachgewiesen werden als auch Ia^{-} -Myeloblasten und Ia^{-} -Promyelozyten (47). Es scheint eine inverse Korrelation zwischen Ia -Antigen-Ausprägung und Reife der myeloischen Reihe innerhalb eines einzelnen Klons zu bestehen (33). Die eigenen Untersuchungen zeigen für die myeloische Form der BC eine geringe bis mäßige Ausprägung von Ia -Antigen, was gut mit den bisherigen Untersuchungsergebnissen übereinstimmt.

Interessanterweise scheint sich für die myeloisch-lymphatische Mischform der BC ein eigenes Markermuster herauszubilden. Myeloische Antigene und $c-ALL$ -Antigen finden sich nur mittelgradig ausgeprägt, und die Untersuchung mit Anti- Ia -Globulin fällt stark positiv aus. Ein derartiger Zusammenhang konnte bei anderen Formen nicht festgestellt werden. Wenn man Ia -Antigen als Kriterium für Reife bzw. Unreife einer Zellart ansieht, so müßte diese Mischform nach der lymphatischen BC als unreifste angesehen werden. Da nur zwei Fälle vorliegen, kann nicht gesagt werden, ob es sich aus hämatologisch-immunologischer Sicht um eine eigene Gruppe handelt.

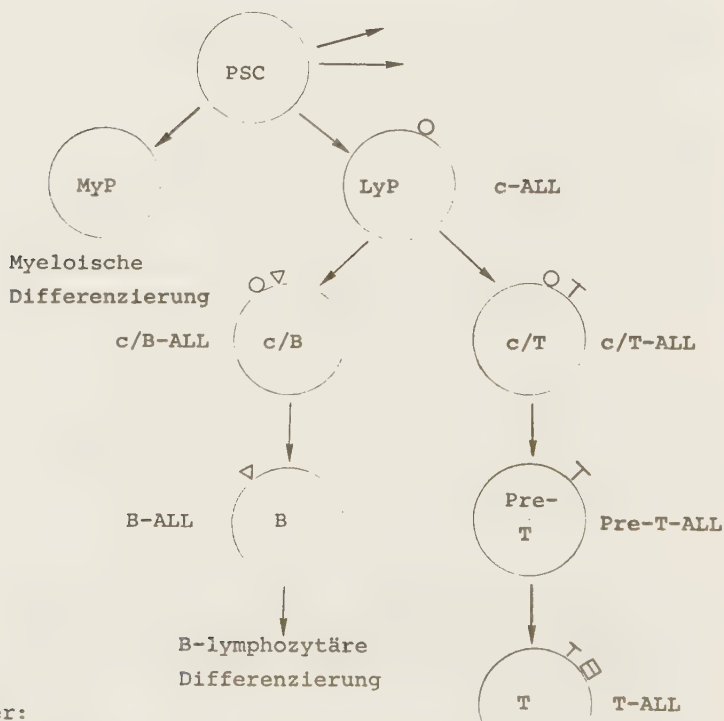
Bei zwei Fällen mit lymphatischer Form der BC zeigt ein Fall ein Markermuster, wie es bisher von anderen beschrieben wurde, der andere (graphisch nicht dargestellt) wies keinerlei Markierung mit myeloischen Antigenen auf. Ia-Antigen war kaum nachweisbar, lediglich c-ALL-Antigen war deutlich ausgeprägt. Da dieser Patient bis sieben Tage vor Blutabnahme unter Thioguanin-Therapie stand, wird der Einfluß einer Zytostatikatherapie auf diese außergewöhnliche Markerausprägung nicht ausgeschlossen.

Die Primäre Blastenkrise beginnt unter dem klinischen Erscheinungsbild einer akuten Leukose und mündet dann in den chronischen Verlauf einer myeloischen Leukämie ein. Dabei fällt auf, daß diese Form der Leukose, bei der ein deutlicher Nachweis von c-ALL-Antigen möglich war, mit keiner oder allenfalls mäßiger Ausprägung von Ia-Antigen einhergeht. Dieses Markierungsmuster erinnert an die für die c-ALL gebildete Gruppe III. Da bei den einzelnen Fällen leider nicht peripheres Blut und Knochenmark für jeden Patienten getestet werden konnte, kann eine eindeutige Zuordnung zu dieser Gruppe nicht getroffen werden.

3. Zusammenfassende Betrachtung über die Ia-Antigen-Ausprägung im Verhältnis zum Differenzierungsgrad leukämischer Zellen

Die Untersuchung von Leukämiezellen in Hinblick auf das Vorkommen von Ia-Antigen sollte eine weiterführende Differenzierung der einzelnen Leukämieklassen ermöglichen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erlauben eine Korrelation von Ia-Antigen mit bisher festgestellten Oberflächenmarkern auf leukämischen Zellen.

Die Diagnose der einzelnen Leukämien basierte auf folgendem Schema (96,80):



Marker:

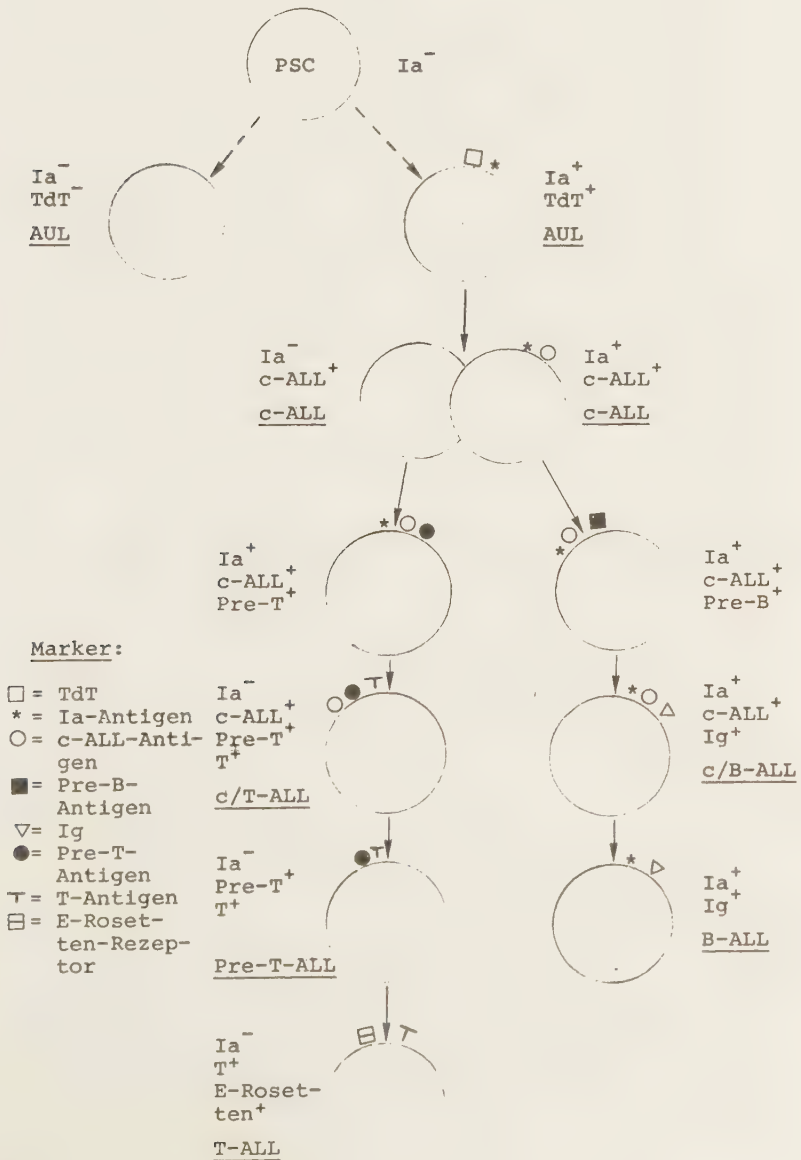
○ = c-ALL-Antigen

▽ = Ig

┐ = T-Antigen

▢ = E-Rosetten-Rezeptor

Ergänzt durch die Befunde für Ia-Antigen wird folgende Zellentwicklung für möglich gehalten:



Es konnte nicht geklärt werden, ob Stammzellen Ia^+ oder Ia^- sind. Eine Ausprägung von Ia-Antigen auf Stammzellen wird zur Zeit nicht angenommen (35,4,66).

Bei den Untersuchungen der AUL ließen sich drei Gruppen feststellen. Da diese Zellen sonst keinerlei Oberflächenmarker aufweisen, sondern lediglich TdT als Enzymmarker festgestellt werden kann (97), wird eine Entwicklung bald im Anschluß an die Stammzelle vermutet.

Von oben genanntem Schema (96,80) ausgehend, wird bei dem nächsten Entwicklungsschritt c-ALL-Antigen auf der Zelloberfläche beobachtet. Das gemeinsame Vorkommen von Ia-Antigen und c-ALL-Antigen konnte in vielen Fällen festgestellt werden. Nach dem Schema von Thierfelder et al. (96) erscheint c-ALL-Antigen als frühester Oberflächenmarker auf lymphatischen Zellen. Die Kombination von c-ALL-Antigen und Ia-Antigen auf der Zellmembran könnte möglicherweise den nächsten Entwicklungsschritt im Anschluß an Ia^+ -AUL-Zellen charakterisieren. Allerdings fanden sich auch einige Ia^- -, c-ALL⁺ Leukämien. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß ein Ia-Antigen-Verlust während eines Zellteilungszyklus aufgetreten sein könnte. Nichtsdestotrotz wurde c-ALL-Antigen nachgewiesen.

Im weiteren Verlauf der Reifung scheint eine getrennte Entwicklung von T- und B-Zellen von der Ia^+ , c-ALL⁺-Zelle ausgehend vonstatten zu gehen. Bei einigen von mir untersuchten Leukämien konnte die Markerkombination Ia-Antigen, c-ALL-Antigen und Pre-T-Antigen konstatiert werden. In Analogie zu dieser ersten Zelle der T-Zellreihe wird von Greaves et al. (37) und Brouet et al. (13) das Markermuster von Ia-Antigen, c-ALL-Antigen und Pre-B-Antigen als charakteristisch für eine frühe Stufe der B-Zellentwicklung beschrieben.

Im weiteren Verlauf der T-Zellreifung konnte Ia-Antigen von mir nicht mehr nachgewiesen werden.

B-Lymphozyten weisen Ia-Antigen auch im ausgereiften Zustand der Zelle auf. Die B-lymphozytären Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie können hierfür als beispielhaft angeführt werden. Hier finden sich Oberflächenimmunglobulin, Rezeptoren für Mäuseerythrozyten, Rezeptoren für die C3-Komplementkomponente und Ia-Antigen, wie bereits von anderen Autoren auch beschrieben wurde (siehe IV. 2.2).

Die vorliegende Arbeit ergänzt also das den Diagnosen der Leukämien zugrunde liegende Schema insofern als die akuten undifferenzierten Leukämien in das Konzept der Zellreifung integriert werden können, und Ia-Antigen bei c-ALL eine weitere Aufschlüsselung dieser Leukämie erlaubt. Das Vorkommen von Ia-Antigen bei frühesten Entwicklungsstufen der T-Zellen wurde bisher noch nicht beschrieben.

4. Bedeutung des Bakterienbindungstests im Rahmen immunologischer Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode vorgestellt, die es ermöglicht, antigene Determinanten nachzuweisen und gleichzeitig die Morphologie der Zelle, an der die Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat nach entsprechender Färbung z. B. mit May-Grünwald-Giemsa zu beurteilen.

Der Methode liegt folgendes Prinzip zugrunde: ein Protein A synthetisierender Staphylokokkus-aureus-Stamm dient als Indikator für eine abgelaufene Antigen-Antikörper-Reaktion. Protein A kann sich mit dem Fc-Teil von Antiglobulinmolekülen verbinden (56). Wenn es zu einer Kopplung von Antigenen und Antikörpern gekommen ist, resultiert eine rosettenartige Anlagerung von Bakterien um die Zelle.

Vorteile der Methode sind, daß eine relativ geringe Zellzahl für den Test ausreicht, und er somit nach Einsendung von Untersuchungsmaterial ohne Schwierigkeiten zusätzlich in das Panel anderer Testmethoden aufgenommen werden kann. Der Test zeichnet sich durch hohe Spezifität aus, da nur das zu untersuchende Antigen mit dem zugehörigen Antiglobulinmolekül eine Verbindung eingehen kann mit konsekutiver Bakterienanlagerung an die Antiglobuline.

Auch erscheint es denkbar, daß das in den vorliegenden Untersuchungen benutzte Anti-Ia-Globulin durch andere Antiseren ersetzt wird. Dies könnte dann von Bedeutung sein, wenn ein gegen ein bestimmtes Antigen neu entwickeltes Antiserum hergestellt worden ist, und wenn dann überprüft werden soll, auf welcher Zellart sich nun dieses Antigen befindet.

Zu Beginn der Diskussion wurde bereits auf diskrepante Befunde bezüglich der Ia-Antigen-Ausprägung besonders bei myeloischen Zellen und Monozyten hingewiesen. Anhand des Rosettentests konnte gezeigt werden, daß Ia-Antigen auf Myeloblasten, Myelozyten und Metamyelozyten zu finden ist. Dieses Ergebnis entstammt der Untersuchung einer normalen Knochenmark-Blut-Probe.

Bei dem einen untersuchten Fall mit AML wurde eine relativ homogene Zellpopulation vorwiegend aus Myeloblasten und unreifen, atypischen Zellen bestehend, vorgefunden. Eine spezifische Markierung mit Anti-Ia-Globulin und Bakterien konnte dabei nicht festgestellt werden.

Monozyten phagozytieren die Bakterien in den allermeisten Fällen. Als Rarität wurde ein Ia⁺ Monozyt gesehen (Abb. 16).

Anhand dieser Ergebnisse kann also gezeigt werden, daß dieses Testsystem in einem Arbeitsgang immunologische und morphologische Erkenntnisse erbringen kann.

Auf der anderen Seite treten die Grenzen des Tests zu Tage, wenn sowohl eine Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte als auch eine große Subpopulation von Lymphozyten vorliegt, die Bakterien spontan, d. h. ohne Antiglobulin, binden kann. Dieses auch von anderen Autoren bei CLL beschriebene Phänomen konnte auch bei zwei von mir untersuchten Proben beobachtet werden. Allerdings handelt es sich dabei um eine c-ALL und eine Prolymphozyten-Leukämie. Nach den Untersuchungen von Nelson findet sich eine relativ höhere Rate von Lymphozyten mit spontan gebundenen Bakterien korreliert mit einem klinisch frühen oder asymptomatischen Stadium der CLL. Ein Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Oberflächenimmunoglobulin kann auch in den von mir untersuchten Fällen nicht gesehen werden (c-ALL, Ig polyvalent: 1 %, Prolymphozyten-Leukämie, Ig polyvalent: 22 %). Eine Bindung über ein Kohlenhydrat auf der Bakterienzellmembran und ein Protein mit lektinartigen Eigenschaften auf der Zellmembran wird diskutiert (93,67).

Die Bedeutung dieses Phänomens liegt in seiner zusätzlichen Charakterisierungsmöglichkeit der genannten Leukämieklassen.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausprägung von Ia-Antigen auf leukämischen Zell-Populationen untersucht. Als Testsysteme wurden der Zytotoxizitätstest und ein Bakterienbindungstest verwendet. Diese Methoden ermöglichen den Antigennachweis durch Ablauf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Beim Zytotoxizitätstest werden positive Zellen durch komplementabhängige Lyse nachweisbar verändert. Beim Bakterienbindungstest werden positive Zellen durch Bakterienanlagerung sichtbar gemacht. Durch Anfärbung der Zellaustriche ist zusätzlich noch eine gleichzeitige Beurteilung der Zellmorphologie möglich. Die Ergebnisse dieser und anderer immunologischer Untersuchungsmethoden erlauben zusammen mit zytochemischen Befunden eine weiterführende Klassifizierung akuter und chronischer Leukose über morphologische Aspekte hinaus. Die genaue Aufschlüsselung der Leukämien erwies sich in Hinblick auf Therapie und Prognose der Erkrankung als bedeutsam.

Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests wurden mit den Befunden anderer für die jeweilige Leukämie spezifischen Oberflächenmarkeruntersuchungen korreliert. Um den Ausprägungsgrad des Ia-Antigens im Zytotoxizitätstest zu charakterisieren, wurden drei Gruppen gebildet: eine Gruppe mit hohen, eine mit mittlerem und eine Gruppe ohne Antigenvorkommen.

Bei verschiedenen Formen der akuten lymphatischen Leukämien (c-ALL, c-ALL-Rezidive) und akuten myeloischen Leukämien konnte das Vorkommen aller drei Ausprägungsgrade festgestellt werden. Bei 36,4 % der bisher durch keinen Oberflächenmarker weiter zu klassifizierenden akuten undifferenzierten Leukämien konnte eine hohe, bei 22,7 % eine mittlere Ia-Antigen-Ausprägung nachgewiesen werden. Bei der lymphatischen und bei der

myeloisch-lymphatischen Form im Blastenschub bei chronisch myeloischer Leukämie und bei chronisch lymphatischen Leukämien konnte mit Hilfe von Anti-Ia-Globulin ein hoher Prozentsatz lysierter Zellen festgestellt werden. C/T- und T-ALL wiesen kein Ia-Antigen auf.

Der Bakterienbindungstest ermöglichte zusätzliche Aussagen über die Ia-Antigen-Ausprägung im Ablauf der Differenzierung auf Zellen der Granulopoese, auf Monozyten und lymphozytären Zellen. Mit Hilfe des Zytotoxizitätstests und durch Einsatz eines neu entwickelten Testsystems (Bakterienbindungstest) zum Nachweis der Ia-Antigen-Ausprägung konnte eine weiterführende Differenzierung besonders der akuten Leukämien erreicht werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas, A.K., Dorf, M.E., Karnovsky, M.J., Unanue, E.R.:
The distribution of Ia antigens on the surface of lymphocytes.
J. Immunol. 116, 371 (1976)
2. Aiuti, F., Wigzell, H.:
Function and distribution of human lymphocytes. I. Production of anti-T-lymphocyte specific sera as estimated by cytotoxicity and elimination of function of lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 13, 171 (1973)
3. Bach, J.F., Dormont, J., Dardenne, M., Balner, H.:
In vitro inhibition by antihuman antilymphocyte serum. Correlation with skin graft prolongation in subhuman primates.
Transplant. 8, 265 (1969)
4. Basch, R.S., Janossy, G., Greaves, M.F.:
Murine pluripotential stem cells lack Ia antigen.
Nature 270, 520 (1977)
5. Beard, M.E.J., Durrant, J., Catovsky, D.:
Blast crisis of chronic myeloid leukaemia. I. Presentation simulating acute lymphoid leukaemia.
Brit. J. Haemat. 34, 167 (1976)
6. Begemann, H., Rastetter, J., Kaboth, W.:
Klinische Haematologie (2. Auflage)
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1975).
7. Belpomme, D., Borella, L., Braylan, R., Greaves, M., Herbermann, R., Hitzig, W., Kersey, J., Petrov, R., Ritts, R., Seligman, M., Sobin, L., Thierfelder, S., Torrigiani, G.:
Immunological diagnosis of leukaemia and lymphoma: a world health organization/international union of immunological societies technical report.
Brit. J. Haemat. 38, 85 (1978)
8. Bianco, C., Patrick, R., Nussenzweig, V.:
A population of lymphocytes bearing a membrane receptor of antigen antibody complement complexes. I. Separation and characterization.
J. Exp. Med. 132, 702 (1970)

9. Billing, R., Rafizadeh, B., Drew, I., Hartman, G., Gale, R., Terasaki, P.:
Human B-lymphocyte antigens expressed by lymphocytic and myelocytic leukemia cells. I. Detection by rabbit antisera.
J. Exp. Med. 144, 167 (1976)
10. Böyum, A.:
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl.), 97 (1968)
11. Borella, L., Sen, L.:
E receptors on blasts from untreated acute lymphocytic leukemia (ALL): comparison of temperature dependence of E rosettes formed by normal and leukemic lymphoid cells.
J. Immunol. 114, 187 (1975)
12. Brouet, J.C., Flandrin, G., Seligman, M.:
Indications of the thymus-derived nature of the proliferating cells in six patients with Sézary's syndrome.
N. Engl. J. Med. 16, 341 (1973)
13. Brouet, J.C., Preud'homme, J.L., Penit, C., Valensi, F., Rouget, P., Seligman, M.:
Acute lymphoblastic leukemia with pre-B-cell characteristics.
Blood, 54, 269 (1979)
14. Brouet, J.C., Valensi, F., Daniel, M.T., Flandrin, G., Preud'homme, J.L., Seligman, M.:
Immunological classification of acute lymphoblastic leukemias: evaluation of its clinical significance in a hundred patients.
Brit. J. Haematol. 33, 319 (1976)
15. Burnet, F.M.:
The clonal selection theory of acquired immunity.
Cambridge University Press, London (1959)
16. Catovsky, D., Cherchi, M., Okos, A., Hege, U., Galton, D.A.G.:
Mouse red cell rosettes in B-lymphoproliferative disorders.
Brit. J. Haemat. 33, 173 (1976)
17. Catovsky, D., Galetto, J., Okos, A., Miliani, E., Galton, D.A.G.:
Cytochemical profile of B and T leukaemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukaemia.
J. Clin. Path. 27, 767 (1974)

18. Catovsky, D., Galton, D.A.G.:
Cell markers and the classification of acute leukaemia. In: Immunological diagnosis of leukemias and lymphomas. Eds.: Thierfelder, S., Rodt, H., Thiel, E.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 25 (1977)
19. Chessels, J.M., Hardisty, R.M., Rapson, N.T.:
Acute lymphoblastic leukaemia in children: classification and prognosis.
Lancet ii, 1307 (1977)
20. Dachs, D.H., Cone, J.L.:
A mouse "B"-cell alloantigen determined by gene(s) linked to the major histocompatibility complex.
J. Exp. Med. 138, 1289 (1973)
21. Dickler, H.B., Kunkel, H.G.:
Interaction of aggregated γ -Globulin with B-lymphocytes.
J. Exp. Med. 136, 191 (1972)
22. Espinouse, D., Touraine, J.L., Schmitt, D., Revol, L.:
Specific anti-hairy cell and anti-B cell antisera: characterization of surface antigens and origin of hairy cells.
Clin. Exp. Immunol. 39, 756 (1980)
23. Fröland, S.S.:
Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker for T-lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 1, 269 (1972)
24. Fröland, S.S., Natwig, J.B.:
Surface-bound immunoglobulin as a marker of B-lymphocytes in man.
Nature, 234, 251 (1971)
25. Fröland, S.S., Natwig, J.B.:
Surface-bound immunoglobulin on lymphocytes from normal immunodeficient humans.
Scand. J. Immunol. 1, 1 (1972)
26. Gahmberg, C.G., Jokinen, M., Anderson, L.C.:
Expression of the major sialoglycoprotein (glycophorin) on erythroid cells in human bone marrow.
Blood 52, 379 (1978)

27. Galton, D.A.G., Goldman, J.M., Wiltshaw, E., Catovsky, D., Henry, K., Goldenberg, G.J.:
Prolymphocytic leukaemia.
Brit. J. Haemat. 27, 7 (1974)
28. Galton, D.A.G., Wiltshaw, E., Boesen, E., Speed, D.E., Hollyhock, V., Goldenberg, G.J.:
Prolymphocytic leukaemia.
British Empire Cancer Campaign for Research 41st Annual Report, S. 55 (1963)
29. Goldstone, A.H., McVerry, B.A., Janossy, G., Walker, H.:
Clonal identification in acute lymphoblastic leukemia.
Blood 53, 892 (1979)
30. Greaves, M.F.:
Clinical applications of cell surface markers.
Prog. Haematol. 9, 255 (1975)
31. Greaves, M.F.:
Cell surface characteristics of human leukaemic cells.
Essays in Biochem. 15, 78 (1979)
32. Greaves, M.F., Brown, G.:
Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells.
Clin. Immunol. Immunopathol. 4, 67 (1975)
33. Greaves, M.F., Janossy, G.:
Patterns of gene expression and the cellular origins of human leukaemias.
Biochem. Biophys. Act. 516, 193 (1978)
34. Greaves, M.F., Janossy, G., Roberts, M., Rapson, N.T., Ellis, R.B., Chessels, J., Lister, T.A., Catovsky, D.:
Membrane phenotyping: diagnosis, monitoring and classification of acute "lymphoid" leukemias.
In: Immunological diagnosis of leukemia and lymphomas, Eds.: Thierfelder, S., Rodt, H., Thiel, E. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 61 (1977)
35. Greaves, M.F., Robinson, J.B., Della, D., Ritz, J., Schlossman, S., Sieff, C., Goldstein, G., Kung, P., Bollum, F., Edwards, P.:
Comparative antigenic phenotypes of normal and leukemic hemopoietic precursor cells analysed with a 'library' of monoclonal antibodies.
Im Druck

36. Greaves, M.F., Verbi, W., Festenstein, H., Papasteradis, C., Jaraquemada, D., Hayward, A.:
"Ia-like" antigens on human T cells.
Eur. J. Immunol. 9, 356 (1979)
37. Greaves, M.F., Verbi, W., Vogler, L., Cooper, M., Ellis, R., Ganeshaguru, K., Hoffbrand, V., Janossy, G., Bollum, F.J.:
Antigenic and enzymatic phenotypes of the pre-B subclass of acute lymphoblastic leukaemia.
Leuk. Res. 3, 353 (1979)
38. Haas, R.J., Netzel, B., Janka, G.E., Rodt, H., Thiel, E., Thierfelder S.:
Diagnostischer Einsatz spezifischer Antiseren bei der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters.
Klin. Pädiat. 191, 446 (1978)
39. Hämmerling, G.J.:
Tissue distribution of Ia antigens and their expression on lymphocyte subpopulations.
Transplant. Rev. 30, 65 (1976)
40. Hämmerling, G.J., Eichmann, K.:
Expression of Ia determinants on immunocompetent cells.
Eur. J. Immunol. 6, 565 (1976)
41. Hess, M.:
Ia-Antigens: isolation, chemical modification and structural characterization.
Transplant. Rev. 30, 40 (1976)
42. Huhn, D., Rodt, H., Thiel, E., Grosse-Wilde, H., Fink, U., Theml, H., Jäger, G., Thierfelder, S.:
T-Zell-Leukämien des Erwachsenen.
Blut 33, 141 (1976)
43. Huhn, D., Thiel, E., Rodt, H., Theml, H.:
Prolymphocytic leukemia.
Klin. Wschr. 56, 709 (1978)
44. Humphreys, R.E., McCune, J.M., Chess, L., Herrman, H.C., Malenka, D.J., Mann, D.L., Parham, P., Schlossman, S.F., Strominger, J.L.:
Isolation and immunologic characterization of a human B-lymphocyte-specific cell surface antigen.
J. Exp. Med. 144, 98 (1976)

45. Jäger, G., Hoffmann-Fezer, G., Rodt, H., Huhn, D., Thiel, E., Thierfelder, S.:
Myeloid antigens and antigen densities in mice and men. In: Immunological diagnosis of leukemias and lymphomas, Eds.: Thierfelder, S., Rodt, H., Thiel, E. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 109 (1977)
46. Jäger, G., Hoffmann-Fezer, G., Thiel, E., Ruppelt, W., Thierfelder, S.:
Myeloid membrane markers. I. Expression of marker antigens specific for murine granulocytes and their precursor cells.
Exp. Hemat. 5, 535 (1977)
47. Janossy, G., Goldstone, A.H., Capellaro, D., Greaves, M.F., Kulenkampff, J., Pippard, M., Welsh, K.:
Differentiation linked expression of p23,33 (Ia-like) structures on human leukaemic cells.
Brit. J. Haemat. 37, 391 (1977)
48. Janossy, G., Greaves, M.F., Sutherland, R., Durrant, J., Lewis, C.:
Comparative analysis of membrane phenotypes in acute lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. Leuk. Res. 1, 289 (1977)
49. Jansen, J., Schuit, H.K.E., van Zwet, T.L., Meijer, C.J.L.M., Hijman, W.:
Hairy cell leukaemia: a B-lymphocytic disorder. Brit. J. Haemat. 42, 21 (1979)
50. Jondal, M., Hohn, G., Wigzell, H.:
Surface markers on human T- and B-lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells.
J. Exp. Med. 136, 207 (1972)
51. Jondal, M., Klein, G.:
Surface markers on human B- and T-lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B-lymphocytes.
J. Exp. Med. 138, 1365 (1973)
52. Kaszubowski, P.A., Doodwin, J.S., Williams, R.C.:
Ia antigen on the surface of a subfraction of T cells that bear Fc receptors for Ig G.
J. Immunol. 124, 1075 (1980)

53. Klareskog, L., Sandberg-Trägard, L., Rask, L.,
Lindbloom, J.B., Curman, B., Peterson, P.A.:
Chemical properties of human Ia-Antigen.
Nature 265, 248 (1977)
54. Koeffler, H.P., Niskanen, E., Cline, M., Billing,
R., Golde, D.:
Human myeloid precursors forming colonies in diffu-
sion chambers expresses the Ia-like antigen.
Blood 54, 1188 (1979)
55. Kolb, H.J.:
Knochenmarkstransplantationen bei Knochenmarkaplasie
und akuter Leukämie - Voraussetzungen, Erfolge, In-
dikationen.
Klin. Pädiat. 189, 60 (1977)
56. Kronvall, G., Seal, U.S., Finstad, J., Williams, R.C.:
Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc
fragment of γ G globulin using staphylococcal Pro-
tein A.
J. Immunol. 104, 140 (1970)
57. Landwall, P.:
Dialysis cultivation of bacteria. Optimization of
yields of bacteria and their products.
Dissertation (1977)
58. Lozzio, C.B., Lozzio, B.B.:
Human chronic myelogenous leukemia cell line with
positive philadelphia chromosome.
Blood 45, 321 (1975)
59. Mahmoud, A.A.F., Kellermeier, R.W., Warren, K.S.:
Monospecific antigranulocyte sera against human
neutrophils, eosinophils, basophils, and myeloblasts.
Lancet 3, 1163 (1974)
60. Mayer, P.M., Bratescu, A., Dray, S., Teodorescu, M.:
Enumeration of human B lymphocytes in stained blood
smears by their binding of bacteria.
Clin. Immunol. Immunopath. 9, 37 (1978)
61. McKinney, T.K., Boto, W.O., Spiro, R.C., Humphreys,
R.E.:
Membrane expression and synthesis of p23,33 (HLA-DR
antigen) by human peripheral blood monocytes.
Exp. Hematol. 8, 709 (1980)

62. McKinney, R.M., Spillane, J.T., Pearce, G.W.:
Factors affecting the rate of reaction of fluoresceine isothiocyanate with serum proteins.
J. Immunol. 93, 232 (1964)
63. Michlmayer, G., Huber, H.:
Receptor sites for complement on certain human blood lymphocytes.
J. Immunol. 105, 670 (1970)
64. Minowada, J., Ohnuma, T., Moore, G.E.:
Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for thymus-derived lymphocytes.
J. Nat. Cancer Inst. 49, 891 (1972)
65. Mittal, K.K., Mickey, M.R., Singal, D.P., Terasaki, P.I.:
Serotyping for homotransplantation. XVIII. Refinement of microplet lymphocyte cytotoxicity test.
Transplant. 6, 913 (1963)
66. Moore, M.A.S., Broxmeyer, H.E., Sheridan, A.O.C., Meyers, P.A., Jacobson, N., Winchester, R.J.:
Continuous human bone marrow culture: Ia antigen characterization of probable pluripotential stem cells.
Blood 55, 682 (1980)
67. Nelson, R., Bratescu, A., Teodorescu, M.:
Relationship between bacterial binding to lymphocytes and clinical features in chronic lymphocytic leukemia.
Cancer 44, 1665 (1979)
68. Niaudet, P., Greaves, M.F., Horwitz, D.:
Phenotypes of "null" lymphoid cells in human blood.
Scand. J. Immunol. 9, 387 (1979)
69. Preud'homme, J.L., Seligman, M.:
Surface-bound immunoglobulin as a cell marker in human lymphoproliferative diseases.
Blood 40, 777 (1972)
70. Preud'homme, J.L., Seligman, M.:
Surface immunoglobulins on human lymphoid cells. In "Progress in Clinical Immunology", Grune and Stratton, New York, S. 121 (1974)
71. Reif, A.E., Allen, J.M.V.:
Specificity of isoantisera against leukemia and thymic lymphocytes.
Nature 200, 1332 (1963)

72. Reif, A.E., Allen, I.M.V.:
The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissue.
J. Exp. Med. 120, 413 (1964)
73. Rieber, E.P., Hadam, M.R., Linke, R.P., Saal, J.G., Riethmüller, G., von Heyden, H.W., Waller, H.D.:
Hairy cell leukaemia: surface markers and functional capacities of the leukaemic cells analysed in eight patients.
Brit. J. Haemat. 42, 175 (1979)
74. Riehm, H., Gadner, H., Welte, K.:
Die West-Berliner Studie zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie des Kindes - Erfahrungsbericht nach 6 Jahren.
Klin. Pädiat. 189, 89 (1977)
75. Ringelmann, R.W., Opferkuch, W., Röllinghoff, M., Loos, M.:
Komplementmessungen mit Hilfe des Mikrolitersystems.
Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 154, 329 (1969)
76. Rodt, H.V.:
Herstellung und Spezifität heterologer Anti-T-Lymphozytenserum im Rahmen der Knochenmarkstransplantation und der Leukämiediagnostik.
Habilitationsschrift (1978)
77. Rodt, H., et al.:
Specific antibodies against early and late T-cell subpopulations.
In Vorbereitung
78. Rodt, H., Netzel, B., Thiel, E., Huhn, D., Thierfelder, S.:
ALL-assoziiertes Antigen: Vorkommen auf normalen Blutzellen, Zell-Linien und Leukämiezellen.
Blut 36, 345 (1978)
79. Rodt, H., Netzel, B., Thiel, E., Jäger, G., Huhn, D., Haas, R., Götze, D., Thierfelder, S.:
Classification of leukemic cells with T- and O-ALL-specific antisera.
In: Immunological diagnosis of leukemias and lymphomas, Eds.: Thierfelder, S., Rodt, H., Thiel, E., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 87 (1977)

80. Rodt, H., Thiel, E., Netzel, B., Hoffmann-Fezer, G., Haas, R.J., Deinhardt, F., Thierfelder, S.: Characterization of leukemic cells by antisera against membran antigens: definition of subgroups in ALL and Blastic Crisis of CML. In: *Advances in Comparative Leukemia Research* 1979, S. 253
81. Rodt, H., Thiel, E., Thierfelder, S., Huhn, D., Götze, D., Brehm, G.: Spezifisches Anti-T-Lymphozyten-Globulin (sATG) für die Diagnostik lymphoproliferativer Erkrankungen. *Klin. Wschr.* 54, 361 (1976)
82. Rodt, H., Thierfelder, S., Thiel, E., Götze, D., Netzel, B., Huhn, D., Eulitz, M.: Identification and quantitation of human T-cell antigen by antisera purified from antibodies cross-reacting with hemopoietic progenitors and other blood cells. *Immunogenetics* 2, 411 (1975)
83. Rosenfeld, C., Goutner, A., Kayibanda, B., Venuat, A.M., Choquet, C., Pico, J., Petitou, M., Lorans, G., Tuy, F., Desgrange, C., Bornkamm, G., Dore, J.F., de The, G.: Establishment and characterization of a truly leukemic cell line. In: *Immunological diagnosis of leukemias and lymphomas*, Eds.: Thierfelder, S., Rodt, H., Thiel, E. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 271 (1977)
84. Ross, G.D., Jarowski, C.I., Rabellino, E.M., Winchester, R.J.: The sequential appearance of Ia-like antigens and two different complement receptors during the maturation of human neutrophils. *J. Exp. Med.* 147, 730 (1978)
85. Sallan, S.E., Ritz, J., Pesando, J., Gelber, R., O'Brien, C., Hitchcock, S., Coral, F., Schlossman, F.: Cell surface antigens: prognostic implications in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 55, 395 (1980)
86. Sandrin, M.S., Vaughan, H.A., McKenzie, I.F.C., Tait, B.D., Parish, C.R.: The human Ia system: definition and characterization by xenogenic antisera. *Immunogen.* 8, 185 (1979)

87. Schlossman, S.F., Chess, L., Humphreys, R.E., Strominger, J.L.:
Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 1288 (1976)
88. Schneider, U., Schwenk, H.U., Bornkamm, G.:
Characterization of EBV-genome negative "Null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.
Int. J. Cancer 19, 621 (1977)
89. Simone, J.V., Verzosa, M.S., Rudy, J.A.:
Initial features and prognosis in 363 children with acute lymphocytic leukemia.
Cancer 36, 2099 (1975)
90. Smith, R.W., Terry, W.D., Buell, D.N., Sell, K.W.:
An antigenic marker for human thymic lymphocytes.
J. Immunol. 110, 884 (1973)
91. Stern, A.C., Erb, P., Gisler, R.H.:
Ia-bearing bone marrow-cultured macrophages induce antigen specific helper T cells for antibody synthesis.
J. Immunol. 123, 612 (1979)
92. Taylor, R.B., Duffus, P.H., Raff, M.C., de Petris, S.:
Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody.
Nat. New Biol. 233, 225 (1971)
93. Teodorescu, M., Bratescu, A., Mayer, P.:
The use of natural binding of bacteria for the identification of human T- and B-lymphocyte subpopulation in blood smears.
Clin. Immunol. Immunopath. 13, 194 (1979)
94. Thiel, E., Rodt, H., Huhn, D., Netzel, B., Grosse-Wilde, H., Ganeshaguru, K., Thierfelder, S.:
Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia: evidence for further T subgroups and evaluation of their clinical significance.
Blood 56, 759 (1980)
95. Thiel, E., Rodt, H., Thierfelder, S., Huhn, D., Janka, G., Wündisch, G.F., Bender-Götze, Ch., Netzel, B.:
Immunologische Typisierung und Prognose akuter lymphatischer Leukämien.
Im Druck

96. Thierfelder S., Rodt, H., Thiel, E., Hoffmann-Fezer, G., Netzel, B., Haas, R.J., Wündisch, G.F., Bender-Götze, Ch.:
Immunologic markers for classification of leukemias and non-Hodgkin lymphomas.
Recent Results in Cancer Research 69, 46 (1979)
97. Tsukimoto, L., Wong, K.Y., Lampkin, B.C.:
Surface markers and prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia.
N. Engl. J. Med. 294, 245 (1976)
98. Tuschka, P.J.:
Allogene Knochenmarkstransplantation als Therapie für aplastische Anämie und akute Leukämie.
Immunforschung in Klinik und Labor, Wissenschaftliche Information, Fresenius-Stiftung, 107 (1979)
99. Warnatz, H.:
Immunsystem
In: Klinische Pathophysiologie
Ed.: Siegenthaler, W.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 508 (1979)
100. Wernet, P.:
Human Ia-type alloantigens: methods of detection, aspects of chemistry and biology, markers for disease states.
Transplant. Rev. 30, 271 (1976)
101. Wernet, P., Schunter, F., Wilms, K., Wallner, H.D.:
New aspects in the classification of leukemic cell types by Ia alloantigens and complement receptors.
In: Immunological diagnosis of leukemias and lymphomas, Eds.: Thierfelder, S., Rodt, H., Thiel, E.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 333 (1977)
102. Williams, R.C., De Board, J.R., Mellbye, O.J., Messner, R.P., Lindstrom, F.D.:
Studies of T- and B-lymphocytes in patients with connective tissue disease.
J. Clin. Invest. 52, 283 (1973)
103. Winchester, R.J., Ross, G.D., Jarowski, C.Y., Halper, J., Broxmeyer, H.E.:
Expression of Ia-like antigen molecules on human granulocytes during early phase of differentiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4012 (1977)

104. Winn, H.J.:
The participation of complement in isoimmune reactions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 101, 23 (1962)
105. Wybran, J., Carr, M.C., Fudenberg, H.H.:
The human rosette-forming cells as a marker of a population of thymus-derived cells.
J. Clin. Invest. 51, 2537 (1972)
106. Zipin, C., Cutler, S.J., Reeves, W.J., Lum, D.:
Variation in survival among patients with acute lymphocytic leukemia.
Blood 37, 59 (1971)

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 27. Dezember 1952 in Wuppertal-Elberfeld geboren.

Von Ostern 1959 bis Ostern 1963 besuchte ich die Grundschule in Wuppertal-Cronenberg. Ostern 1963 wurde ich in 5. Klasse des Neusprachlichen Gymnasiums in Wuppertal-Cronenberg aufgenommen. In der 7. Klasse wählte ich den Gymnasialzweig. Nach Abschluß der 10. Klasse wechselte ich die Schule, um an dem Neusprachlichen Gymnasium Else-Lasker-Schüler-Str. in Wuppertal-Elberfeld das Abitur zu machen. 1971 bestand ich die Reifeprüfung.

Im Januar 1972 begann ich an der Lehranstalt für med.-techn. Assistentinnen in Wuppertal-Barmen meine Ausbildung, die ich im Dezember 1973 mit der staatlichen Prüfung abschloß. Von Januar 1974 bis Juni 1974 absolvierte ich das Berufspflichtpraktikum in der Röntgenabteilung des Klinikums Barmen.

Vom 1. Juli bis 30. September arbeitete ich vertretungsweise als MTA im Strahleninstitut von Herrn Dr. med. Ewald, Wuppertal. Vom 1. Januar 1975 bis 30. November 1976 war ich in der Klinik und Poliklinik für Radiologie der Universität München in der Strahlentherapie beschäftigt. Vom 1. Dezember 1976 bis 30. April 1977 war ich als MTA bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung angestellt, wo ich im Sonderforschungsbereich 37 am Klinikum Großhadern, München, arbeitete.

Seit dem 1. Mai 1977 studiere ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Humanmedizin. Ich hoffe, mein Studium im Frühjahr 1983 abschließen zu können.

München, im Herbst 1982

